

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUM
TRANSFER-MECHANISMUS VON
PRUNASIN DURCH DIE
DARMWAND DER RATTE

Robert Stahl

Diss.
München



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0028

Aus dem Walther-Straub-Institut
für
Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. Forth

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUM TRANSFER-MECHANISMUS
VON PRUNASIN DURCH DIE DARMWAND DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

R O B E R T S T A H L

aus Germering
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Forth

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.12.1985

Gewidmet

unserer geliebten Tochter

Daniela Christiane

*„Verlaß Dich auf den Herrn von ganzem Herzen
und verlaß Dich nicht auf Deinen Verstand, sondern
gedenke an Ihn auf allen Deinen Wegen, so wird er
Dich recht führen“.*

Sprüche 3, 5 + 6

Von Herzen danke ich meiner geliebten Ehefrau
Christine für ihre liebevolle Geduld und stete Ermutigung
in der Zeit der Erstellung dieser Arbeit.

Durch Verzicht auf viele Stunden gemeinsamer
Freizeit trug meine Frau zum Gelingen meiner
Promotionsarbeit bei.

Elfriede Kohnke, meiner geliebten Mutter, und ihrem
Ehemann Günter, gilt mein besonderer Dank.

In einem geborgenen Heim legten sie den Grundstein
zur Verwirklichung meines Berufswunsches.

Meinem Bruder Kurt bin ich sehr dankbar für seine
treue Unterstützung während meines Studiums sowie
für die fortwährende innige Verbindung mit ihm und
seiner Frau Ulrike.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	5
3 ERGEBNISSE	8
3.1 Untersuchungen zum Translokationsmechanismus von PRUNASIN	8
3.1.1 Transfer von Prunasin durch die Darmwand in Abhängigkeit von der Konzentration	8
3.1.1.1 Jejunum	8
3.1.1.2 Ileum	11
3.1.1.3 Metabolismus	11
3.1.2 Transfer von Prunasin durch die Darmwand und Gehalt im Gewebe in Abhängigkeit von der Natrium-Konzentration	13
3.1.2.1 Transfer (Jejunum / Ileum)	13
3.1.2.2 Gehalt im Gewebe (Jejunum / Ileum)	16
3.1.3 Transfer durch die Darmwand und Gehalt von Prunasin im Darmgewebe in Abhängigkeit von der Temperatur	16

3.1.3.1	Jejunum	19
3.1.3.2	Ileum	21
3.1.4	Arrhenius-Diagramme des Transfers sowie der Aufnahme von Prunasin ins Darmgewebe in Abhängigkeit von der Temperatur	21
3.1.4.1	Arrhenius-Diagramme des Transfers und der Aufnahme von Prunasin ins Gewebe (Jejunum)	21
3.1.4.2	Arrhenius-Diagramme des Transfers und der Aufnahme von Prunasin ins Gewebe (Ileum)	23
3.1.5	Gewebeakkumulation und Nettoverschiebung von Prunasin im Konzentrationsgleichgewicht bei 37°C und 7°C	26
3.1.6	Einfluß von Prunasin auf den Transfer durch die Darmwand sowie auf den Gehalt von α -Methyl-Glucose im Gewebe	29
4	DISKUSSION	33
4.1	Methodisch-kritische Vorbemerkungen	33
4.2	Wo findet die Resorption von Prunasin statt und gibt es Hinweise auf eine intestinale Biotransformation von Prunasin?	36
4.2.1	Allgemeine Vorbemerkungen	37

4.3	Welche Rückschlüsse können aufgrund der in vitro Untersuchungen auf den Mechanismus des Prunasin-Transfers durch die Darmwand gezogen werden?	38
4.3.1	Zur Konzentrationsabhängigkeit	38
4.3.2	Zur Natriumabhängigkeit	39
4.3.3	Zur Temperaturabhängigkeit	41
4.3.4	Zur Nettoverschiebung von Prunasin ohne initialen Konzentrationsgradienten	43
4.3.5	Zur Hemmwirkung von Prunasin auf den Transport von α -Methyl-Glucose	43
4.4	Schlußfolgerungen	44
5	MATERIAL UND METHODEN	47
5.1	Material	47
5.1.1	Versuchstiere	47
5.1.2	Substanzen	47
5.1.2.1	Prunasin	47
5.1.2.2	Radionuclide	48

5.2	Untersuchungsmethoden zur Resorption von Prunasin	49
5.2.1	Inkubation isolierter, nicht durchbluteter Darmsäckchen nach der Methode von Wilson und Wiseman	49
5.2.2	Aufarbeitung der Darmsegmente nach der Methode von Wilson und Wiseman	51
5.2.3	Durchströmung isolierter, nicht durch- bluteter Darmsegmente nach der Methode von Fisher und Parsons	52
5.2.3.1	Präparation	52
5.2.3.2	Perfusion	54
5.2.4	Beurteilung der Leistungsfähigkeit isolierter, nicht durchbluteter Darmsegmente in vitro	55
5.2.4.1	Evertierte und nicht evertierte Darmsegmente nach der Methode Wilson und Wiseman	55
5.2.4.2	Isoliert durchströmte Darmsegmente nach der Methode von Fisher und Parsons	56
5.2.5	Inkubationsmedien	56
5.2.5.1	Tyrodelösung	56

5.3	Analytische Methoden	57
5.3.1	Glucosebestimmung	57
5.3.2	Elektrolytbestimmung	57
5.3.3	pH-Wert Bestimmung	58
5.3.4	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	58
5.3.5	Messung der Radioaktivität	59
5.3.6	Messung des Intra- und Extrazellulärraums	60
5.3.6.1	Berechnung: Gesamtverteilung Extrazellulärverteilung Intrazellulärverteilung	61
5.3.7	Statistische Methoden	62
5.3.8	Bedeutung verwendeter Kürzel	62
6	LITERATURVERZEICHNIS	64
7	TABELLEN	69

KAPITEL 1 - ZUSAMMENFASSUNG

a) Die Untersuchungen zum Translokationsmechanismus von Prunasin durch die Darmwand erfolgten "in vitro" an isoliert perfundierten sowie an evertierten und nicht evertierten Jejunum- und Ileumsegmenten der Ratte.

b) Die Untersuchungen des Transfers durch die Darmwand und des Gehaltes von Prunasin im Darmgewebe zeigen, daß Prunasin im Dünndarm, insbesondere im proximalen Jejunum, bevorzugt von der Mucosa- zur Serosaseite bewegt wird.

Im proximalen Jejunum wird Prunasin sowohl im Darmgewebe ($TC/M = 1,52$) als auch auf der Serosaseite ($S/M = 1,47$) des Darmpräparates innerhalb von 120 min gegen einen chemischen Gradienten angereichert.

Dagegen beobachtet man im terminalen Ileum weder eine Anreicherung von Prunasin im Darmgewebe ($TC/M = 0,88$) noch auf der Serosaseite ($S/M = 0,13$).

c) Untersuchungen mittels der HPLC-Technik ergaben in beiden geprüften Dünndarmabschnitten keinerlei Hinweis auf eine nennenswerte metabolische Umwandlung von Prunasin während des Durchtritts durch die Darmwand. Mehr als 99 % des initialen Prunasin-Angebotes konnten nach 120 min Versuchsdauer als unverändertes Prunasin identifiziert werden.

d) Die Konzentrationsabhängigkeit des Transfers von Prunasin durch die Darmwand wurde an isoliert perfundierten, nicht durchbluteten Jejunum- und Ileumsegmenten in einem Konzentrationsbereich von 1 - 1000 $\mu\text{mol/l}$ geprüft.

Am proximalen Jejunum verläuft der transmurale Durchtritt konzentrationsabhängig, d.h. mit steigenden Prunasin-Konzentrationen konvergiert die transportierte Menge pro cm und min gegen einen Grenzwert. Die maximale Transportgeschwindigkeit V_T beträgt $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Halbsättigungskonstante $[S_{0,5}]$ beträgt $4,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$.

e) Zur Prüfung der Frage eines natriumabhängigen Co-Transportes wurde der transmurale Durchtritt von Prunasin unter natriumarmen Bedingungen an isoliert perfundierten Jejunum- und Ileumsegmenten untersucht. Am proximalen Jejunum verzeichnet man bei 58 mmol/l Na^+ eine signifikante Abnahme des Prunasin-Transfers von der Mucosa- zur Serosaseite im Vergleich zur Kontrolle (150 mmol/l Na^+). Dagegen hat die Na^+ -Reduktion am terminalen Ileum keinen Einfluß auf den Prunasin-Transfer.

f) Die Temperaturabhängigkeit des Transfers und des Gehaltes von Prunasin im Gewebe wurde an evertierten (J_{ms} , TC_m) und nicht evertierten (J_{sm} , TC_s) Jejunum- und Ileumsegmenten bei 37°C , 27°C , 17°C und 7°C geprüft.

Senkt man die Temperatur des Organbades von 37°C (Kontrolle) auf 27°C , wird der Prunasin-Transfer im proximalen Jejunum von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms}) um 71 % reduziert. Eine weitere Absenkung der Temperatur bis auf 7°C führt zu keiner weiteren Reduzierung des Transfers. Gleichzeitig beobachtet man eine signifikante Abnahme des Gehaltes von Prunasin im Darmgewebe (TC_m) bei 7°C im Vergleich mit der Kontrolle (37°C).

Die ermittelten Aktivierungsenergien E für den Transfer (J_{ms}) bzw. den Aufnahmeprozeß ins Gewebe (TC_m) betragen 22,5 kcal/mol bzw. 8,8 kcal/mol (und deuten auf einen carrier-vermittelten Transportvorgang hin).

Dagegen erweist sich der Transfer (J_{sm}) und der Gehalt von Prunasin im Gewebe (TC_s) von der Serosa- zur Mucosaseite als unabhängig von der Temperatur.

Am terminalen Ileum ist sowohl der Transfer und Gehalt im Gewebe von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms} , TC_m) als auch in umgekehrter Richtung (J_{sm} , TC_s) unabhängig von der Inkubationstemperatur.

g) In Gegenwart von Prunasin (100 μ mol/l) wird der Transfer und Gehalt von α -Methylglucose im Jejunumgewebe signifikant reduziert.

h) Aufgrund der vorliegenden Resultate kann festgestellt werden, daß es sich beim Translokationsvorgang von Prunasin durch die Darmwand im proximalen Jejunum mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen aktiven, durch Carrier vermittelten Transportprozeß handelt. Hierbei ist zu trennen zwischen dem Gehalt im Gewebe, der etwas über den Vorgang der Aufnahme ins Darmgewebe aussagt, und dem Transfer durch das Mucosa-epithel, in dem auch die Abgabe zur Serosaseite enthalten ist. Am proximalen Jejunum erfolgt offensichtlich sowohl die Aufnahme von Prunasin ins Gewebe als auch die Abgabe zur Serosaseite trägervermittelt. Dagegen gibt es für das terminale Ileum keinerlei Hinweise auf ein akkumulierendes Transportsystem, d.h. der Prunasin-Transport erfolgt in diesem Darmabschnitt per diffusionem.

SUMMARY

Prunasin (D-mandelonitrile- β -D-glucoside) is the primary metabolite formed in the small intestine from the essentially unabsorbed amygdalin (D-mandelonitrile- β -D-gentiobioside).

The transepithelial transfer and tissue content of prunasin was investigated on isolated reperfused segments and everted sacs of the rat jejunum and ileum. Within a concentration range of 1 - 1,000 $\mu\text{mol/l}$ the transfer of prunasin across the jejunal border tended to follow saturation kinetics ($V_{\text{max}} = 1.6 \mu\text{mol/l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $S_{0.5} = 460 \mu\text{mol/l}$).

In the distal ileum, however, this transfer was proportional to the prunasin concentration in the mucosal test solution. Lowering the sodium in the perfusion medium from 150 to 58 mmol/l jejunal prunasin transfer was reduced by 85 p. 100, ileal transfer slightly increased. Under these conditions tissue content in jejunum and ileum increased by 130 and 65 p. 100, respectively.

Only mucosa-to-serosa transfer and corresponding tissue accumulation of prunasin required apparently high activation energies as indicated by their temperature dependency. Furthermore, transfer and tissue content of α -methylglucoside (500 $\mu\text{mol/l}$) is inhibited in the presence of prunasin (100 $\mu\text{mol/l}$).

These results suggest the existence of a specific transfer system for a cyanogenic glycoside localized probably at the side of the jejunum (24).

KAPITEL 2 - EINLEITUNG

Prunasin ist der primäre Metabolit des cyanogenen Glycosids Amygdalin, das in den Kernen verschiedener Steinfrüchte (z. B. Pfirsich, Aprikose, Kirsche und Bittermandel) vorkommt. Besonderes Interesse genießt Amygdalin in den U.S.A. seit ca. drei Jahrzehnten in der sog. "nicht-offiziellen" Medizin als Krebstherapeutikum (Laetrile^(R)).

Nach oraler Anwendung kann es, insbesondere nach Gabe höherer Dosen, zu Toxizitätserscheinungen kommen, die auf die Freisetzung von Blausäure zurückzuführen sind (2) (3) (15) (16).

Frühere pharmakokinetische Untersuchungen von Rauws et al. (19) zeigten, daß intaktes Amygdalin aus dem Gastrointestinaltrakt von Hund und Ratte kaum resorbiert wird.

Aus Untersuchungen von Smith (23) an Mäusen geht hervor, daß bereits geringe Dosen von Amygdalin oral appliziert tödlich wirken, während sehr viel höhere Dosen parenteral verabreicht hingegen unbeschadet überstanden werden. Diese Befunde legten die Vermutung nahe, daß Amygdalin bereits während des Durchtritts durch die Darmwand metabolisch umgewandelt wird. Aufgrund einer in vitro Studie an isoliert perfundierten Rattendärmen, konnte der Nachweis erbracht werden, daß Amygdalin bereits im oberen Dünndarm unter Abspaltung des terminalen Glucoseresestes zu Prunasin hydrolysiert wird (25).

Dabei erfolgt die Hydrolyse des terminalen Glucoserestes, wie neuere Untersuchungen von Strugala und Forth (28) zeigen, durch spezifische β -Glucosidase-Aktivitäten des Dünndarmes selbst, und nicht - wie häufig in der Literatur beschrieben - durch unspezifische Enzyme der mikrobiellen Darmflora (3) (15) (16). Während demnach intestinale β -glucosidische Aktivitäten lediglich die Hydrolyse des terminalen Glucoserestes katalysieren, bewirken β -glucosidische Aktivitäten der Darmflora eine vollständige Hydrolyse bis zum Benzaldehyd unter Freisetzung von Cyanid und stellen somit die wahrscheinlichste Ursache für die beobachteten Intoxikationen dar.

Das bedeutet, daß oral zugeführtes Amygdalin im proximalen Dünndarm zu Prunasin hydrolysiert und als solches in den Organismus gelangt, sofern es nicht tiefere Darmregionen erreicht. In der Leber wird weder Prunasin noch Amygdalin weiter verstoffwechselt (26). Die Ausscheidung von Prunasin erfolgt vorwiegend über die Nieren (15) (19).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den transepithelialen Durchtritt von Prunasin durch die Darmwand von der Mucosa- zur Serosaseite sowie die Aufnahme (Akkumulation) ins Darmgewebe zu untersuchen. Die Untersuchungen hierzu wurden in vitro, d.h. teils an isoliert perfundierten Jejunum- und Ileumsegmenten von Ratten nach der Methode von Fisher und Parsons (6), teils an evertierten und nichtevertierten Darmsäckchen des Jejunum und Ileum in Anlehnung an die Methode von Wilson und Wiseman (30) durchgeführt.

Zur näheren Charakterisierung des Translokationsvorganges von Prunasin durch das Mucosaepithel wurde der transepitheliale Durchtritt von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms}) in Abhängigkeit von der Prunasinkonzentration geprüft.

Die Reduktion der Natriumkonzentration im Perfusionsmedium diente dem Nachweis eines vom Natriumgradienten abhängigen Transferprozesses. Zur Prüfung der Frage, ob der Prunasin-Transfer und die Aufnahme ins Gewebe (J_{ms} , TC_m) von der Mucosa- zur Serosaseite bzw. in umgekehrter Richtung vom zellulären Stoffwechsel abhängig ist, wurden Experimente bei verschiedenen Inkubationstemperaturen durchgeführt und die Aktivierungsenergien für die jeweilige Aufnahme ins Gewebe (TC_m, TC_s) sowie des Durchtritts (J_{ms} , J_{sm}) ermittelt. Eine mögliche Interaktion von Prunasin und α -Methylglucose beim transepithelialen Durchtritt sowie bei der Aufnahme ins Gewebe wurde untersucht, um herauszufinden, ob Prunasin aufgrund seiner Strukturmerkmale die Transporteinrichtungen für Zucker zu benutzen vermag.

KAPITEL 3 - ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zum Translokationsmechanismus von PRUNASIN

3.1.1 Transfer von Prunasin durch die Darmwand in Abhängigkeit von der Konzentration

Die Prüfung des transepithelialen Durchtritts von Prunasin durch die Darmwand von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms}) wurde in Abhängigkeit von steigenden Prunasin-Konzentrationen an isoliert durchströmten, nicht durchbluteten Jejunum- und Ileumsegmenten nach der Methode von Fisher und Parsons (6) modifiziert durch Richter und Strugala (21) vorgenommen. Hierzu wurde Prunasin in einem Konzentrationsbereich von 1 - 1000 $\mu\text{mol/l}$ der Perfusionslösung zugesetzt und der Transfer zur Serosaseite (J_{ms}) geprüft. Die Versuchsdauer betrug 120 min; die Temperatur 37°C. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Tabelle I zusammengefaßt und in den Abb. 1 und 3 dargestellt.

3.1.1.1 Jejunum

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, konvergiert die Transportgeschwindigkeit für Prunasin pro cm und min mit steigenden Prunasin-Konzentrationen gegen einen Grenzwert; d.h. der Transfer zeigt im abschätzbaren Bereich Sättigungscharakteristik.

Aus Kostengründen wurde auf eine Untersuchung im Bereich um 500 $\mu\text{mol/l}$ mit dem kostspieligen Prunasin verzichtet.

JEJUNUM

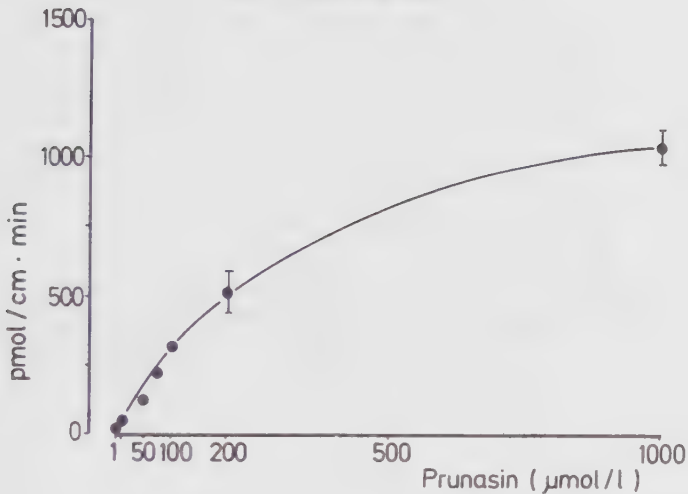


Abb. 1

Transfer durch die Darmwand von Prunasin an isoliert perfundierten Jejunumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration

Methode: Fisher und Parsons (6), modifiziert durch Richter und Strugala (21)

Versuchsdauer: 120 min; Temperatur: 37°C

Zu Versuchsbeginn wurde Prunasin in einer Konzentration von 1 - 1000 µmol/l der Perfusionslösung zugesetzt.

Am Versuchsende wurde die zur Serosaseite transportierte Menge an Prunasin pro cm und min berechnet.

Die Meßpunkte entsprechen Mittelwerten aus 4 - 8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (vergl. Tab. I im Anhang).

Ordinate: Transportierte Menge an Prunasin in $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Abzisse: Prunasin-Konzentration in der Perfusionslösung in µmol/l

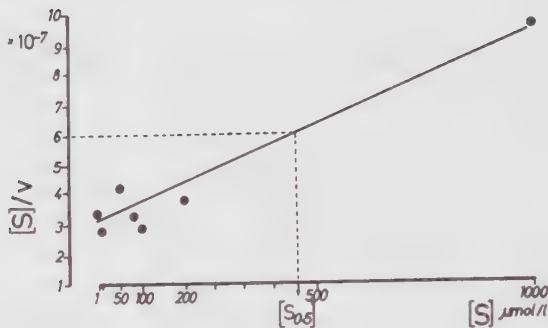


Abb. 2

Lineartransformation nach Hanes (9) des Transfers von Prunasin durch die Darmwand von der Mucosa- zur Serosaseite

Ordinate: $[S]/v$; wobei $[S]$ = Prunasin-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ und v = Transportgeschwindigkeit in $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (vergl. Tab. I im Anhang).

Aus der Steigung der Geraden $= 1/V_T$ bzw. dem Schnittpunkt mit der Ordinate $[S_{0,5}]/V_T$ kann die maximale Transportgeschwindigkeit V_T bzw. die Halbsättigungskonstante $[S_{0,5}]$ ermittelt werden.

$$V_T = 1,55 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$[S_{0,5}] = 4,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

Achsenabschnitt: $2,93 \cdot 10^{-7}$; Steigung: $6,46 \cdot 10^{-4}$

Korrelationskoeffizient: 1,0.

Zur Sicherung des Sättigungseffektes beim Transfer von Prunasin von der Mucosa- zur Serosaseite, wurde die Lineartransformation nach Hanes (9) gewählt, bei der $[S]/v$ gegen $[S]$ aufgetragen wird. Aus dieser Darstellung (Abb. 2, Tab. I) ergibt sich eine Gerade, aus deren Steigung $1/V_T$ sowie dem Schnittpunkt mit der Ordinate $[S_{0,5}]/V_T$, die maximale Transportgeschwindigkeit V_T bzw. die Halbsättigungskonstante $[S_{0,5}]$, abgeschätzt werden kann.

Für die maximale Transportgeschwindigkeit V_T ergibt sich ein Wert von $1,54 \cdot 10^{-6}$ mol/cm · min. Die Halbsättigungskonstante $[S_{0,5}]$ beträgt $4,55 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

3.1.1.2 Ileum

Im terminalen Ileum wurde der Transfer von Prunasin in einem Konzentrationsbereich von 10 - 1000 μ mol/l geprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. I zusammengefaßt und in Abb. 3 dargestellt. Dabei zeigte sich, daß der trans-epitheliale Durchtritt von Prunasin zur Serosaseite in diesem Abschnitt des Darmtraktes keine Anzeichen einer Sättigungscharakteristik aufweist, sondern mit steigender Konzentration proportional zunimmt ($r = 0,9987$).

3.1.1.3 Metabolismus

Zur Klärung der Frage, ob Prunasin während des Durchtritts durch die Darmwand in nennenswertem Umfang metabolisch umgewandelt wird, wurden die Ultrafiltrate von Perfusat, Resorbat und Homogenat des Dünndarmgewebes mit Hilfe der HPLC-Technik untersucht.

ILEUM

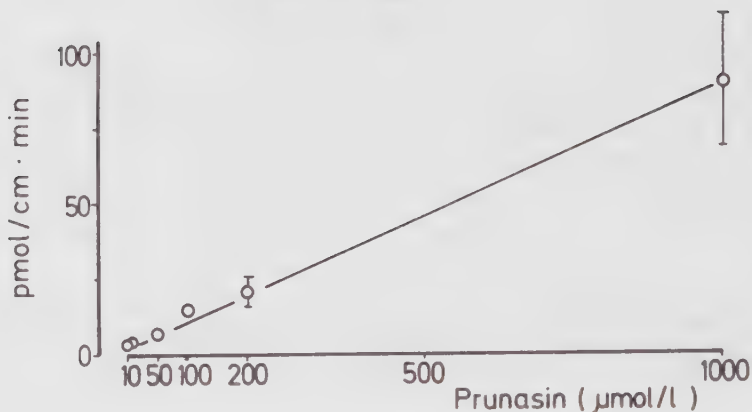


Abb. 3

Transfer durch die Darmwand von Prunasin an isoliert durchströmten Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Konzentration

Methode: Fisher und Parsons (6), modifiziert durch Richter und Strugala (21)

Versuchsdauer: 120 min; Temperatur: 37°C

Zu Versuchsbeginn wurde Prunasin in einer Konzentration von 10 - 1000 µmol/l der Perfusionslösung zugesetzt.

Am Versuchsende wurde die zur Serosaseite transportierte Menge an Prunasin gemessen und pro cm und min berechnet.

Die Meßpunkte entsprechen Mittelwerten aus 3 - 6 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (vergl. Tab. I im Anhang).

Ordinate: Transportierte Menge an Prunasin in $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Abszisse: Prunasin-Konzentration in der Perfusionslösung in µmol/l

Wie aus Tabelle 1 und Abbildung 4 hervorgeht, beobachtet man während der Perfusionsdauer von 120 min weder im proximalen Jejunum noch im terminalen Ileum metabolische Umwandlungsprodukte. Die Summe der wiederaufgefundenen Prunasin-Konzentrationen in den drei geprüften Kompartimenten (Perfusat, Darmhomogenat, Resorbat), ergibt für das Jejunum eine Wiederauffindungsrate von 100,4 % bzw. 106,6 % für das terminale Ileum.

Aufgrund dieser Befunde kann davon ausgegangen werden, daß Prunasin während der transepithelialen Passage keiner nennenswerten präsystemischen Biotransformation unterliegt und somit im folgenden von einem Prunasin-Transfer gesprochen werden kann.

3.1.2 Transfer von Prunasin durch die Darmwand und Gehalt im Gewebe in Abhängigkeit von der Natrium-Konzentration

Der Transfer von Prunasin durch die Darmwand von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms}) sowie der Gehalt im Gewebe (TC_m) in Abhängigkeit von den Natrium-Konzentrationen wurde an isoliert durchströmten Jejunum- und Ileumsegmenten geprüft. Hierzu wurde im Perfusionsmedium die Natrium-Konzentration bis auf 58 mmol/l erniedrigt und jeweils durch Cholinchlorid ersetzt, um die Osmolarität des Puffersystems aufrechtzuerhalten.

3.1.2.1 Transfer (Jejunum / Ileum)

Der Transfer von Prunasin durch die Darmwand (J_{ms}) ist am proximalen Jejunum natriumabhängig; d.h. reduziert man die Na^+ -Konzentration in der Perfusionslösung, vermindert sich der transepitheliale Transport zur Serosaseite.

Tabelle 1

Nachweis von PRUNASIN in Ultrafiltraten von Perfusat,
Resorbat und Homogenat des Dünndarmgewebes nach 120 min
Versuchsdauer

Säule: RP C18 - Elutionsmittel: Wasser/Acetonitril

(85 : 15) (V/V)

Fluß: 1,0 ml x min⁻¹ - Detektion: 215 nm

Retentionszeit: 5,89 ± 0,02

Initiale Prunasinkonzentration des Perfusat: 100 µmol/l

Die Zahlenangaben entsprechen Mittelwerten ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) aus

4 - 6 Einzelversuchen (n).

PERFUSAT (µmol/l)		GEHALT IM GEWEBE (nmol/g FG)		RESORBAT (µmol/l)	
JEJUNUM	ILEUM	JEJUNUM	ILEUM	JEJUNUM	ILEUM
99,13 ± 0,80 (6)	105,76 ± 0,60 (6)	982,73 ± 70,25 (5)	840,14 ± 81,40 (6)	239,91 ± 12,90 (6)	20,84 ± 3,58 (4)

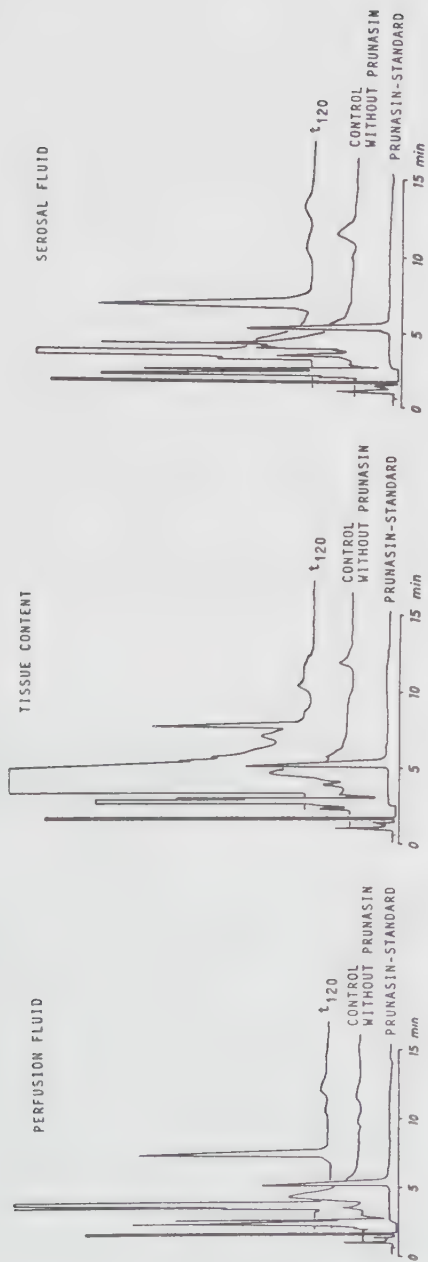


Abb. 4

HPLC-Analyse der Ultrafiltrate von Perfusat, Resorbat sowie Darmhomogenat

Methode: Fisher und Parsons (6), modifiziert durch Richter und Strugala (21)

Versuchsdauer: 120 min; Temperatur: 37°C

Säule: RP C18 - Elutionsmittel: Wasser/Acetonitril (85 : 15) (V/V)

Fluß: 1,0 ml · min⁻¹ - Detektion: 215 nm - Retentionszeit: 5,89 ± 0,02

Demgegenüber beobachtet man am terminalen Ileum eher eine leichte, wenn auch statistisch nicht signifikante Erhöhung des Prunasin-Transfers zur Serosaseite (vergl. Abb. 5 und 6 mit den Ergebnissen in Tab. II).

3.1.2.2 Gehalt im Gewebe (Jejunum / Ileum)

Untersucht man den Gehalt an Prunasin im Darmgewebe (TC_m) in Abhängigkeit von der Natrium-Konzentration, zeigt sich im proximalen Jejunumgewebe lediglich bei der niedrigsten geprüften Na^+ -Konzentration (58 mmol/l) eine signifikante Erhöhung des Gehalts an Prunasin .

Am terminalen Ileum erhöht sich schon bei 80 mmol/l Natrium der Gehalt an Prunasin im Darmgewebe, läßt sich aber durch weiteres Absenken der Na^+ -Konzentration auf 58 mmol/l nicht weiter steigern (siehe Abb. 5 und 6 sowie die Ergebnisse in Tab. II).

3.1.3 Transfer durch die Darmwand und Gehalt von Prunasin im Darmgewebe in Abhängigkeit von der Temperatur

Zur Prüfung der Frage, ob der transepitheliale Durchtritt durch die Darmwand vom zellulären Stoffwechsel des Mucosa-epithels abhängt, wurde der Transfer sowie der Gehalt an Prunasin im Gewebe in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Hierzu wurden entweder evertierte (J_{ms} , TC_m) oder nicht evertierte (J_{sm} , TC_s) Jejunum- und Ileumsegmente nach der Methode von Wilson und Wiseman bei verschiedenen Temperaturen (37°C, 27°C, 17°C und 7°C) inkubiert. Prunasin wurde in einer Konzentration von 100 μ mol/l entweder auf der Mucosaseite evertierter (J_{ms} , TC_m) oder aber auf der Serosaseite nicht evertierter (J_{sm} , TC_s) Jejunum- und Ileumsegmente angeboten.

JEJUNUM

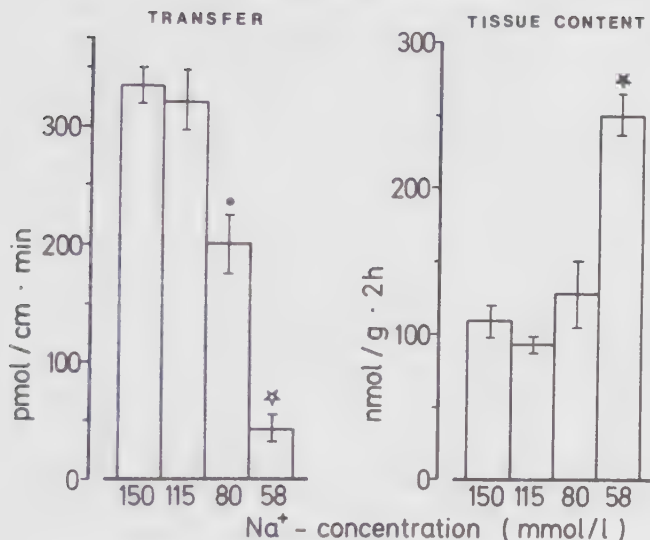


Abb. 5

Transfer durch die Darmwand von Prunasin und Gehalt im Gewebe des Jejunum in Abhängigkeit der Natrium-Konzentration

Methode: Fisher und Parsons (6), modifiziert durch Richter und Strugala (21)

Versuchsdauer: 120 min; Temperatur: 37°C

Zu Versuchsbeginn wurde Prunasin der Perfusionslösung in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt. Die Natrium-Konzentration wurde schrittweise reduziert und durch Cholinchlorid ersetzt.

Am Versuchsende wurde die transportierte Menge an Prunasin gemessen und pro cm und min sowie der Gehalt im Darmgewebe pro g Feuchtgewicht berechnet.

Die Säulen entsprechen Mittelwerten aus 4 - 7 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (vergl. Tab. II im Anhang).

Ordinaten: Transportierte Menge an Prunasin in $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; Gehalt im Gewebe in $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{2h}^{-1}$

Abzisse: Natrium-Konzentration in der Perfusionslösung in mmol/l

● $p \leq 0,010$ * $p \leq 0,0001$ ** $p \leq 0,002$

ILEUM

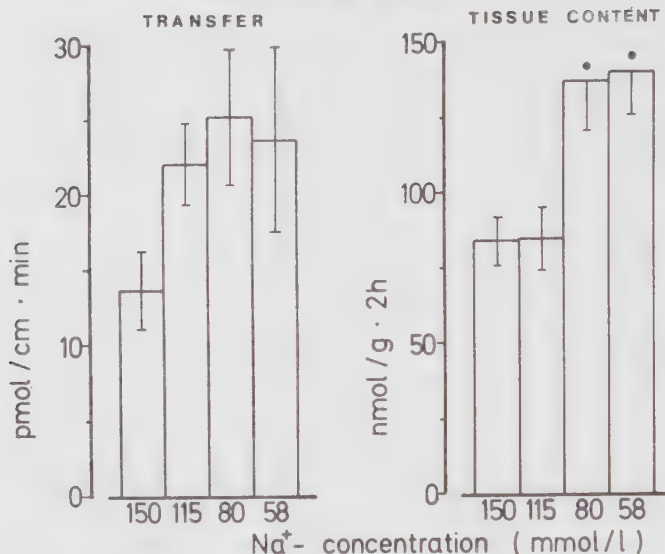


Abb. 6

Transfer durch die Darmwand von Prunasin und Gehalt im Gewebe des Ileum in Abhängigkeit der Natrium-Konzentration

Methode: Fisher und Parsons (6), modifiziert durch Richter und Strugala (21)

Versuchsdauer: 120 min; Temperatur: 37°C

Zu Versuchsbeginn wurde Prunasin der Perfusionslösung in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt. Die Natrium-Konzentration wurde schrittweise reduziert und durch Cholinchlorid ersetzt.

Am Versuchsende wurde die transportierte Menge an Prunasin gemessen und pro cm und min sowie der Gehalt im Darmgewebe pro g Feuchtgewicht berechnet.

Die Säulen entsprechen Mittelwerten aus 4 - 7 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (vergl. Tab. II im Anhang).

Ordinaten: Transportierte Menge an Prunasin in $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; Gehalt im Gewebe in $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$

Abszisse: Natrium-Konzentration in der Perfusionslösung in mmol/l

● $p \leq 0,020$

Am Versuchsende wurde der Transfer von Prunasin zur jeweils anderen Seite sowie der Gehalt im Darmgewebe bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe sind für das Jejunum in Tabelle III zusammengefaßt und in Abbildung 7 graphisch dargestellt sowie für das Ileum in Tabelle III und Abbildung 8.

3.1.3.1 Jejunum

Senkt man die Inkubationstemperatur von 37°C (Kontrollen) auf 27°C, so vermindert sich der Transfer an Prunasin von der Mucosa- zur Serosaseite im proximalen Jejunum statistisch signifikant um ca. 70 %.

Der gebildete Temperaturquotient Q_{10} beträgt 3,5 und stimmt recht gut mit den für die meisten chemischen Reaktionen ermittelten Quotienten (2 - 4) überein.

Eine Absenkung der Inkubationstemperatur auf 17°C bzw. 7°C führt zu keiner weiteren Verminderung des Prunasin-Transfers. Demgegenüber erweist sich der transepitheliale Durchtritt von Prunasin in umgekehrter Richtung von der Serosa- zur Mucosaseite (J_{sm}) als unabhängig von der Temperatur des Organbades.

Betrachtet man den Gehalt an Prunasin im Gewebe evertierter Jejunumsegmente nach initialem Prunasin-Angebot auf der Mucosaseite (TC_m), so zeigt sich, daß die Fähigkeit zur Anreicherung von Prunasin ins Darmgewebe bei abgesenkter Inkubationstemperatur von 7°C auf ca. 50 % abnimmt im Vergleich zur Kontrolle (37°C) sowie den Temperaturen 27°C und 17°C.

Die Aufnahme von Prunasin ins Darmgewebe bei einem initialen Angebot auf der serosalen Seite (TC_s) verläuft wie beim Transfer (J_{sm}) unabhängig von der Temperatur (vergl. Tab. III, Abb. 7).

JEJUNUM

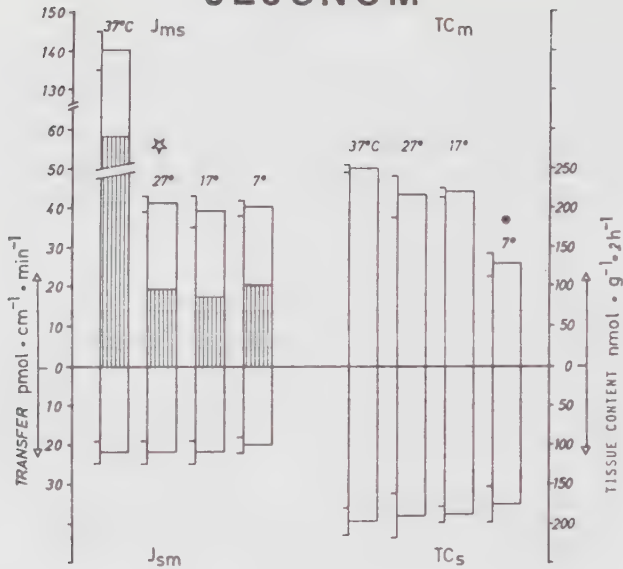


Abb. 7

Transfer durch die Darmwand und Gehalt von Prunasin im Gewebe an evertierten und nicht evertierten Jejunumsegmenten in Abhängigkeit von der Temperatur

Methode: Wilson und Wiseman (30)

Versuchsdauer: 120 min

Prunasin wurde zu Versuchsbeginn in einer Konzentration von 100 µmol/l entweder auf der Mucosa- (J_{ms}, TC_m) evertierter oder auf der Serosaseite (J_{sm}, TC_s) nicht evertierter Darmsäckchen angeboten.

Die Säulen entsprechen Mittelwerten aus 4 - 10 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (vergl. Tab. III im Anhang).

Der schraffierte Anteil der Säulen entspricht dem Nettotransfer (J_{net} = J_{ms} - J_{sm}) von Prunasin.

Linke Ordinate: Transportierte Menge an Prunasin in pmol · cm⁻¹ · min⁻¹

Rechte Ordinate: Gehalt von Prunasin im Darmgewebe in nmol · g⁻¹ · 2h⁻¹

Die Ordinaten-Maßstäbe sind unterschiedlich.

☆ p ≤ 0,0001 ● p ≤ 0,001

3.1.3.2 Ileum

Am terminalen Ileum erweist sich der Transfer bzw. der Gehalt von Prunasin ins Gewebe sowohl von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms} , TC_m) wie auch in der umgekehrten Richtung (J_{sm} , TC_s) als unabhängig von der Inkubationstemperatur (vergl. Tab. III, Abb. 8).

3.1.4 Arrhenius-Diagramme des Transfers sowie des Gehalts von Prunasin ins Darmgewebe in Abhängigkeit von der Temperatur

Zur präziseren Erfassung der Temperaturabhängigkeit des Prunasin-Transportes wurden Arrhenius-Diagramme des Transfers sowie der Aufnahme ins Darmgewebe erstellt (1) (11).

Dazu wurde die logarithmierte Transportgeschwindigkeit ($v_T = \text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) bzw. die logarithmierte Aufnahme ins Gewebe ($v_{TC} = \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$) gegen die reziproke absolute Temperatur ($1/T$) in °Kelvin aufgetragen. Diese Auftragung ergibt eine Gerade, aus der die scheinbare Aktivierungsenergie 'E' berechnet werden kann.

3.1.4.1 Arrhenius-Diagramme des Transfers und des Gehalts von Prunasin ins Gewebe (Jejunum)

Betrachtet man den Prunasin-Transfer von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms}), fällt auf, daß die Gerade bei der Übergangstemperatur von 27°C spontan abknickt und einen bilinearen Verlauf nimmt, während die entsprechende Funktion für den Transfer in umgekehrter Richtung J_{sm} ganz offensichtlich flacher und linear verläuft. Aus der graphischen Darstellung wurde für den J_{ms} -Transfer eine scheinbare Aktivierungsenergie $E = 22,5 \text{ kcal/mol}$ ermittelt.

ILEUM

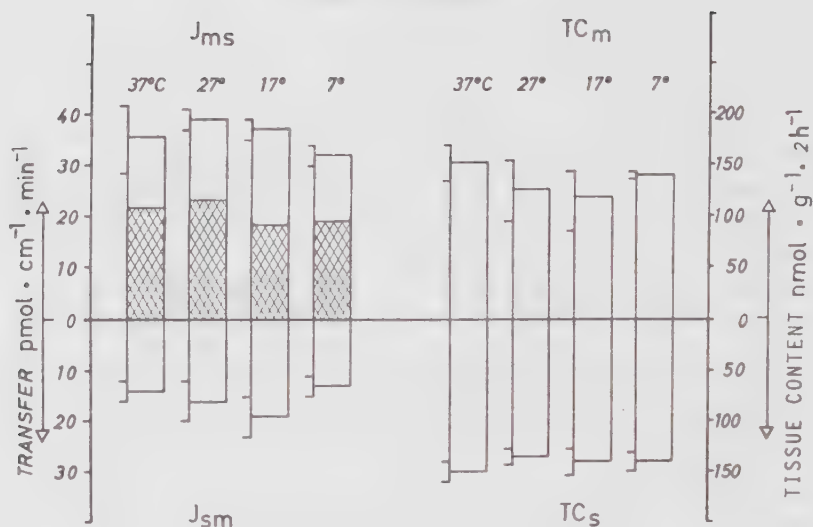


Abb. 8

Transfer durch die Darmwand und Gehalt von Prunasin im Gewebe an evertierten und nicht evertierten Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Temperatur

Methode: Wilson und Wiseman (30)

Versuchsdauer: 120 min

Prunasin wurde zu Versuchsbeginn in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ entweder auf der Mucosa- (J_{ms} , TC_m) evertierter oder auf der Serosaseite (J_{sm} , TC_s) nicht evertierter Darmsäckchen angeboten.

Die Säulen entsprechen Mittelwerten aus 4 - 10 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (vergl. Tab. III im Anhang).

Der schraffierte Anteil der Säulen entspricht dem Nettotransfer ($J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$) von Prunasin.

Linke Ordinate: Transportierte Menge an Prunasin in $\text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Rechte Ordinate: Gehalt von Prunasin im Darmgewebe in $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$

Die Ordinaten-Maßstäbe sind unterschiedlich.

Prinzipiell ähnliche Kurvenverläufe beobachtet man, wenn der Gehalt von Prunasin im Darmgewebe als Arrhenius-Diagramm in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet wird. Während sich auch hier die Steigung der Geraden (TC_m) im geprüften Temperaturbereich (17°C) ändert, ergibt sich für den Gehalt von Prunasin im Gewebe, das von der Serosaseite (TC_s) aus angeboten wurde, eine streng lineare Beziehung. Die ermittelte Aktivierungsenergie für die Aufnahme von Prunasin ins Darmgewebe von der Mucosaseite (TC_m) beträgt 8,8 kcal/mol (vergl. Abb. 9, Tab. III im Anhang).

Die Resultate zeigen, daß sowohl der transepitheliale Durchtritt (J_{ms}) wie auch die Aufnahme ins Gewebe (TC_m) von der Mucosa- zur Serosaseite Aktivierungsenergien > 4 kcal/mol aufweisen und somit die Annahme eines stoffwechselabhängigen Transportes von Prunasin im proximalen Jejunum unterstützen.

3.1.4.2 Arrhenius-Diagramme des Transfers und der Aufnahme von Prunasin ins Gewebe (Ileum)

Dagegen zeigen die Arrhenius-Diagramme für den Transfer bzw. die Aufnahme von Prunasin ins Ileumgewebe sowohl von der Mucosa- (J_{ms} , TC_m) als auch von der Serosaseite (J_{sm} , TC_s) erwartungsgemäß eine streng lineare Beziehungen. Der Verlauf der Geraden ist flach; die Aktivierungsenergien sind < 1 kcal/mol, was für eine einfache physikalische Reaktion spricht (11) (vergl. Abb. 10, Tab. III im Anhang).

JEJUNUM

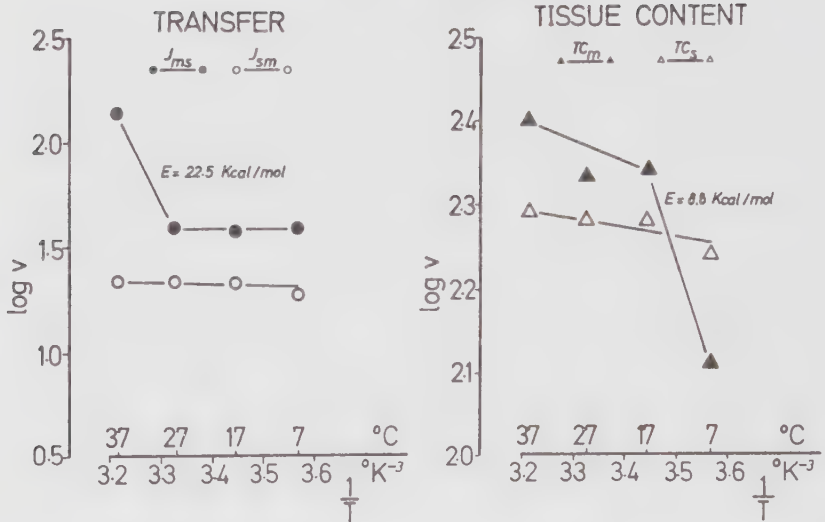


Abb. 9

Arrhenius-Diagramm der Temperaturabhängigkeit des Transfers durch die Darmwand bzw. der Aufnahme von Prunasin ins Darmgewebe an evertierten und nicht evertierten Jejunumsegmenten zwischen 37°C und 7°C

Die Daten wurden ermittelt aufgrund der in Abbildung 7 dargestellten und in Tab. III (Anhang) verzeichneten Meßwerte.

Ordinate TRANSFER: Logarithmus der Transportgeschwindigkeit $v = \text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei 37°C, 27°C, 17°C und 7°C.

Ordinate TISSUE CONTENT: Logarithmus der Aufnahme ins Gewebe $v = \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{2h}^{-1}$ bei 37°C, 27°C, 17°C und 7°C.

Abszisse: Reziproke absolute Temperatur in Grad Kelvin ($^{\circ}K$).

Die Ordinatenmaßstäbe sind unterschiedlich.

Berechnung der Aktivierungsenergie E:

$$E = 2.303 R \frac{\Delta \log v}{\Delta \frac{1}{T}}, \quad \text{wobei } R = 1,987$$

ILEUM

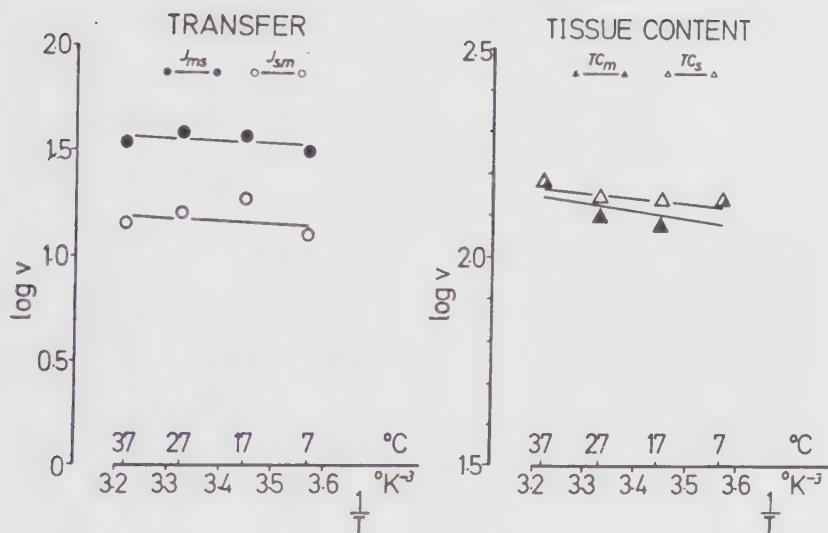


Abb. 10

Arrhenius-Diagramm der Temperaturabhängigkeit des Transfers durch die Darmwand bzw. der Aufnahme von Prunasin ins Darmgewebe an evertierten und nicht evertierten Ileumsegmenten zwischen 37°C und 7°C

Die Daten wurden ermittelt aufgrund der in Abbildung 8 dargestellten und in Tab. III (Anhang) verzeichneten Meßwerte.

Ordinate TRANSFER: Logarithmus der Transportgeschwindigkeit $v = \text{pmol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei 37°C, 27°C, 17°C und 7°C.

Ordinate TISSUE CONTENT: Logarithmus der Aufnahme ins Gewebe $v = \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{2h}^{-1}$ bei 37°C, 27°C, 17°C und 7°C.

Abzisse: Reziproke absolute Temperatur in Grad Kelvin (°K).

Die Ordinatenmaßstäbe sind unterschiedlich.

Berechnung der Aktivierungsenergie E:

$$E = 2.303 R \frac{\Delta \log v}{\Delta \frac{1}{T}}, \quad \text{wobei } R = 1,987$$

3.1.5 Gewebeakkumulation und Nettoverschiebung von Prunasin im Konzentrationsgleichgewicht bei 37°C und 7°C

Die Gewebeakkumulation und die Nettoverschiebung von Prunasin ohne initialen Konzentrationsgradienten, d.h. bei äquimolarem Angebot auf beiden Seiten des Darmpräparates in Abhängigkeit von der Temperatur wurde an evertierten Jejunum- und Ileumsegmenten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in den Abb. 11 und 12 graphisch dargestellt und in der Tab. IV zusammengefaßt.

Wie aus Abb. 11 hervorgeht, verringert sich am proximalen Jejunum bei erniedrigter Temperatur (7°C) offensichtlich die Fähigkeit, Prunasin gegen einen deutlichen Konzentrationsgradienten im Darmgewebe zu akkumulieren.

Während unter Kontrollbedingungen (37°C) Prunasin nach 120 min Versuchsdauer auf etwa das 3,5-fache im Darmgewebe gegenüber der initialen Konzentration auf der Mucosa- bzw. Serosaseite angereichert wird, sinkt bei 7°C die Akkumulationsfähigkeit signifikant bis auf etwa das 2-fache ab.

Demgegenüber verzeichnet man am terminalen Ileum keine temperaturabhängige Akkumulation von Prunasin im Darmgewebe. Die Anreicherung von Prunasin im Gewebe bei 37°C (Kontrolle) ist von derjenigen bei 7°C nicht verschieden. In beiden Fällen beträgt die Anreicherung im Darmgewebe im Vergleich zur Konzentration der Inkubationsflüssigkeiten etwa das 1,5-fache.

In diesem Zusammenhang muß die Tatsache berücksichtigt werden, daß die Akkumulation im Gewebe in mmol/g Darm-Feuchtgewicht und die Konzentration der Inkubationsflüssigkeiten in mmol/ml gemessen wurde und die Prunasin-Menge pro Gramm Darm nicht dem Gewebswasser entspricht.

JEJUNUM

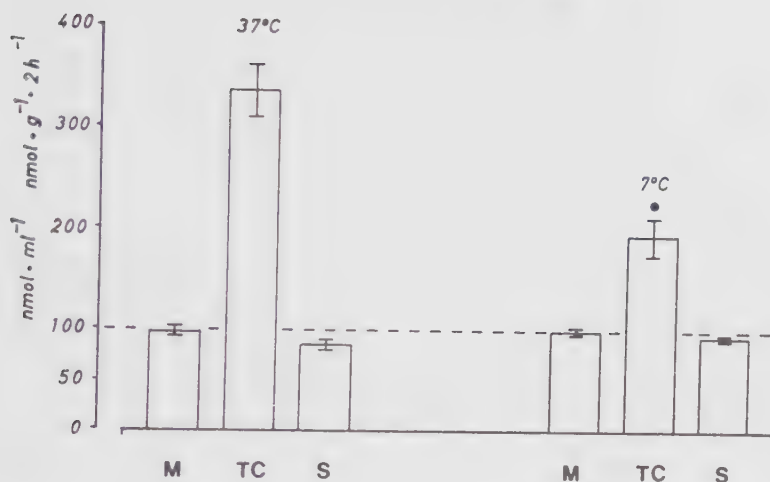


Abb. 11

Nettoverschiebung von Prunasin ohne initialen Konzentrationsgradienten an evertierten Jejunumsegmenten in Abhängigkeit von der Temperatur

Methode: Wilson und Wiseman (30)

Versuchsdauer: 120 min

Zu Versuchsbeginn wurde Prunasin auf beiden Seiten der Darmsäckchen in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ (gestrichelte Linie) zugegeben.

Am Versuchsende wurde die Prunasin-Konzentration in der Mucosa- (M) bzw. der Serosaflüssigkeit (S) sowie im Darmgewebe (TC) bestimmt.

Die Säulen entsprechen Mittelwerten aus 7 - 8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (vergl. Tab. IV im Anhang).

Ordinate: Prunasin-Konzentration in der Mucosa- bzw. Serosaflüssigkeit in $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 2 \text{h}^{-1}$;

Gehalt im Darmgewebe in $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2 \text{h}^{-1}$

● $p \leq 0,001$

ILEUM

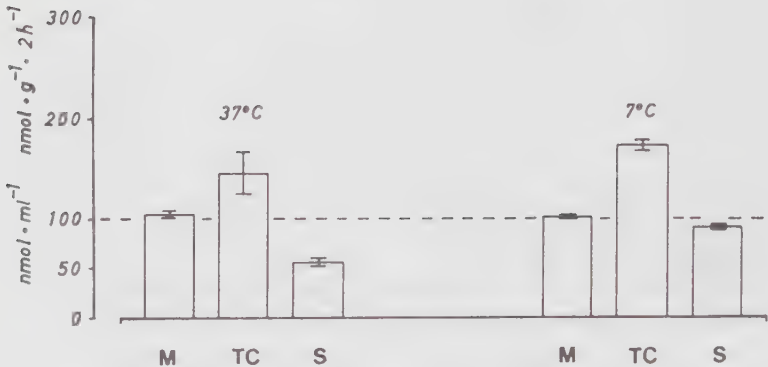


Abb. 12

Nettoverschiebung von Prunasin ohne initialen Konzentrationsgradienten an evertierten Ileumsegmenten in Abhängigkeit von der Temperatur

Methode: Wilson und Wiseman (30)

Versuchsdauer: 120 min

Zu Versuchsbeginn wurde Prunasin auf beiden Seiten der Darmsäckchen in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ (gestrichelte Linie) zugegeben.

Am Versuchsende wurde die Prunasin-Konzentration in der Mucosa- (M) bzw. der Serosaflüssigkeit (S) sowie im Darmgewebe (TC) bestimmt.

Die Säulen entsprechen Mittelwerten aus 7 - 8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (vergl. Tab. IV im Anhang).

Ordinate: Prunasin-Konzentration in der Mucosa- bzw. Serosaflüssigkeit in $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$;

Gehalt im Darmgewebe in $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$

Die Untersuchungen lassen keine Aussage darüber zu, in welchem Maß Prunasin im Gewebe in gelöster oder gebundener Form vorliegt. Sicher kann davon ausgegangen werden, daß Prunasin nicht ausschließlich in frei gelöster Form im Gewebswasser vorliegt, und deshalb die Prunasin-Menge pro Gramm nicht identisch mit dem Gewebswasser ist.

Vergleicht man die finale Prunasin-Konzentration in der Mucosa- bzw. Serosaflüssigkeit mit der initialen Konzentration, fällt sowohl im Jejunum als auch im Ileum auf, daß bei 37°C eine deutlichere und bei 7°C eine geringfügige Abnahme der Prunasin-Konzentration in der Serosaflüssigkeit zu verzeichnen ist (im Ileum wesentlich stärker ausgeprägt als im Jejunum), während sich die Konzentration in der mucosalen Flüssigkeit innerhalb der Versuchszeit praktisch nicht ändert.

Das geht wahrscheinlich darauf zurück, daß es bei initialem Konzentrationsgleichgewicht keine deutliche Nettobewegung von Prunasin weder zur Serosa- noch zur Mucosaseite gibt.

Ein Absinken der Ausgangskonzentration auf der Serosaseite um ca. 10 % ist dadurch erklärbar, daß der Serosaseite mit dem geringen Inkubationsvolumen von 0,8 ml die große Aufnahmekapazität des Darmgewebes gegenübersteht.

3.1.6 Einfluß von Prunasin auf den Transfer durch die Darmwand sowie auf den Gehalt von α -Methyl-Glucose im Gewebe

Im Rahmen der näheren Charakterisierung des Translokationsvorganges von Prunasin im Dünndarm der Ratte, sollte die Frage geklärt werden, inwieweit das cyanogene Glycosid Prunasin aufgrund seiner Strukturmerkmale physiologische

Transporteinrichtungen wie zum Beispiel die für Zucker zu benutzen vermag. Hierzu wurde die nicht verstoffwechselbare ^{14}C -markierte α -Methyl-Glucose eingesetzt, die bekanntermaßen aktiv transportiert wird.

Die Untersuchungen hierzu wurden an evertierten Jejunumsegmenten bei 37°C durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug 30 min. Das Inkubationsmedium enthielt anstelle von D-Glucose 15 mmol/l Dihydroxyaceton als Energieträger.

Zu Versuchsbeginn wurde ^{14}C -markierte α -Methyl-Glucose in einer Konzentration von 5 bzw. 500 $\mu\text{mol/l}$ auf der Mucosa-seite des Darmpräparates angeboten und die Aufnahme ins Darmgewebe sowie der Durchtritt zur Serosaseite in Gegenwart von Prunasin (100 $\mu\text{mol/l}$) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 13 und 14 graphisch dargestellt und in Tab. V (Anhang) zusammengefaßt.

Wie aus den Abbildungen hervorgeht, wird in Gegenwart von Prunasin (100 $\mu\text{mol/l}$) sowohl der transepitheliale Durchtritt als auch die Aufnahme von α -Methyl-Glucose ins Darmgewebe signifikant gehemmt.

Der Transfer wird unabhängig von der eingesetzten α -Methyl-Glucose-Konzentration in Gegenwart von Prunasin um etwa 30% im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen vermindert.

Betrachtet man den Gehalt von α -Methyl-Glucose im Gewebe in Gegenwart von Prunasin, zeigt sich, daß Prunasin bei der niedrigen α -Methyl-Glucose-Konzentration stärker (ca. 80 %) als bei der hohen Konzentration (ca. 45 %) hemmt.

JEJUNUM

TRANSFER

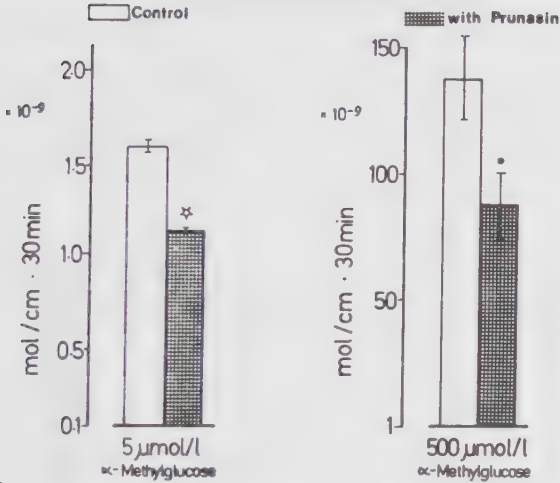


Abb. 13

Transfer von α -Methyl-Glucose an evertierten Jejunum-
segmenten in Gegenwart von Prunasin

Methode: Wilson und Wiseman (30)

Versuchsdauer: 30 min; Temperatur: 37°C

^{14}C - α -Methyl-Glucose wurde zu Versuchsbeginn in einer Konzentration von 5 bzw. 500 $\mu\text{mol/l}$ (= 22.000 dpm/ml) auf der Mucosaseite der Darmsäckchen zugesetzt.

Die Prunasin-Konzentration betrug jeweils 100 $\mu\text{mol/l}$.

Am Versuchsende wurde die ^{14}C -Radioaktivität in der Serosaflüssigkeit bestimmt und in molare Dimensionen umgerechnet.

Die Säulen entsprechen Mittelwerten aus 6 - 8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (vergl. Tab. V im Anhang).

Ordinaten: Die Maßstäbe sind unterschiedlich.

Offene Säulen: Transfer von α -Methyl-Glucose (Kontrollen)

Schraffierte Säulen: Transfer von α -Methyl-Glucose in Gegenwart von Prunasin

★ $p \leq 0,050$ ● $p \leq 0,050$

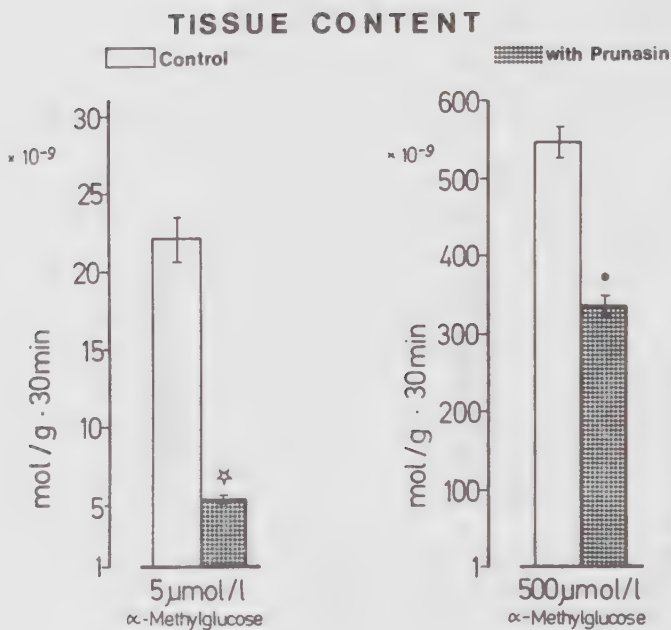


Abb. 14

Gehalt im Darmgewebe von α -Methyl-Glucose an evertierten Jejunumsegmenten in Gegenwart von Prunasin

Methode: Wilson und Wiseman (30)

Versuchsdauer: 30 min; Temperatur: 37°C

Siehe Text zu Abbildung 13

Offene Säulen: Aufnahme ins Gewebe von α -Methyl-Glucose (Kontrollen)

Schraffierte Säulen: Aufnahme ins Gewebe von α -Methyl-Glucose in Gegenwart von Prunasin

☆ $p \leq 0,0001$ ● $p \leq 0,0001$

KAPITEL 4 - DISKUSSION

Die Untersuchungen der Translokationsmechanismen von Prunasin an den Dünndarm-Abschnitten Jejunum und Ileum sollen unter folgenden Aspekten betrachtet bzw. diskutiert werden:

1. Wo findet die Resorption von Prunasin statt und gibt es Hinweise auf eine intestinale Biotransformation von Prunasin?
2. Welche Rückschlüsse können aufgrund der in vitro Untersuchungen auf den Mechanismus des Prunasin-Transfers durch die Darmwand gezogen werden?

4.1 Methodisch-kritische Vorbemerkungen

Die Untersuchungen zum Transport von Prunasin durch die Darmwand wurden in vitro, an isolierten, nicht durchbluteten Darmsegmenten der Ratte nach den Methoden von Wilson und Wiseman (30) bzw. Fisher und Parsons (6) modifiziert durch Richter und Strugala (21) durchgeführt, die zuvor einiger methodisch-kritischer Erörterungen bedürfen:

Die experimentellen Untersuchungen wurden an den Dünndarm-abschnitten Jejunum und Ileum durchgeführt.

Zum Studium des Translokationsvorganges von Prunasin durch die Darmwand in Resorptionsrichtung (J_{ms}) sowie der Aufnahme ins Gewebe von der Mucosaseite (TC_m) wurden evertierte Darmsegmente eingesetzt. Nicht evertierte Darmsegmente dienten zur Überprüfung der Prunasin-Bewegung in Sekretionsrichtung (J_{sm}) sowie der Aufnahme ins Gewebe von der Serosaseite (TC_s).

Durch diese Versuchsanordnung ist es experimentell möglich, selbst geringe Konzentrationsänderungen in der Innenlösung der Darmsäckchen zu erfassen. Die Darmpräparate wurden in zwei verschiedenen Typen von Experimenten eingesetzt:

a) Messung der unidirektionalen Netto-Bewegung von Prunasin sowohl der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms}) als auch in umgekehrter Richtung (J_{sm}). Dabei wurde Prunasin zu Versuchsbeginn entweder auf der Mucosaseite (J_{ms} , TC_m ; evertierte Darmsäckchen) oder auf der Serosaseite (J_{sm} , TC_s ; nicht evertierte Darmsäckchen) der Darmpräparate angeboten und der Transfer von Prunasin durch die Darmwand auf die andere Seite sowie der Gehalt im Gewebe bestimmt.

b) Messung der Netto-Bewegung von Prunasin im Konzentrations-Gleichgewicht. Hierzu wurde Prunasin auf beiden Seiten der Darmpräparate in äquimolaren Konzentrationen zugesetzt. Am Versuchsende wurde die Konzentration in der Innen- und Außenlösung sowie der Gehalt an Prunasin im Darmgewebe bestimmt. In dieser Versuchsanordnung wurden nur evertierte Darmsäckchen benutzt.

Die Aussagekraft dieser beiden Versuchstypen ist unterschiedlich. Der Versuch im Konzentrations-Gleichgewicht gibt lediglich die Bilanz aus beiden Netto-Fluxen wieder und erlaubt keinerlei Rückschlüsse auf unidirektionale Netto-Verschiebungen von Prunasin von der Mucosa- zur Serosaseite bzw. in der umgekehrten Richtung. Mit dieser Methodik läßt sich erfassen, insbesondere bei Angebot niedriger Konzentrationen, ob die Darmsegmente einen Stoff bevorzugt in eine Richtung bewegen. Am everted sac Präparat kann nämlich auch die Bewegung eines Stoffes in Sekretionsrichtung verfolgt werden (10).

Isoliert durchströmte, nicht durchblutete Darmsegmente nach der Methode von Fisher und Parsons (6), modifiziert durch Richter und Strugala (21), zeichnen sich dadurch aus, daß sie, begünstigt durch den Durchströmungsdruck auf der Mucosaseite von ca. 25 cm H₂O, eine leicht meßbare Resorptionsleistung für Flüssigkeit zeigen.

Am Jejunum wird in der Stunde ca. 1 ml/10 cm Darmlänge resorbiert, am Ileum gerade etwa die Hälfte. Werden die Darmabschnitte mit Hemmstoffen des Zellstoffwechsels vergiftet oder wird ihnen ein energielieferndes Substrat oder Sauerstoff entzogen, dann verringert sich die Transportleistung für Flüssigkeit. Die Resorption von Flüssigkeit und Elektrolyten stimmt recht gut mit den in der Literatur berichteten Resorptionsdaten überein (7) (8) (12) (21) (22).

Deshalb werden die nach dieser Methode isoliert durchströmten Darmsegmente immer dann benutzt, wenn mit der Prüfung des Durchtritts eines Stoffes durch die Darmwand gleichzeitig seine Auswirkungen auf andere physiologische Transportleistungen miterfaßt werden soll. Außerdem eignen sich diese Darmpräparationen auch gut für Untersuchungen der metabolischen Umwandlung eines Stoffes während des Durchtritts, weil die innerhalb der Versuchszeit von 2 Stunden gewonnenen Resorbatmengen die Analytik erleichtern.

4.2 Wo findet die Resorption von Prunasin statt und gibt es Hinweise auf eine intestinale Biotransformation von Prunasin?

Die Überprüfung der unidirektionalen Netto-Flüsse von Prunasin haben ergeben, daß Prunasin in den beiden geprüften Dünndarmabschnitten (Jejunum/Ileum) bevorzugt von der Mucosa- zur Serosaseite transferiert wird.

Berechnet man die Differenz der transportierten Menge an Prunasin, $J_{\text{net}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}}$, dann ergibt sich eine Nettoverschiebung von Prunasin zur Serosaseite. Dabei zeigt sich, daß der Nettotransport im proximalen Jejunum etwa 5 mal höher ist als im terminalen Ileum.

Die Gewebeakkumulation liegt im Jejunum um gut die Hälfte höher als im Ileum.

Die Resorption von Prunasin findet demnach in beiden Darmsegmenten statt, wobei als Hauptort der Resorption das proximale Jejunum angesehen werden kann.

Die Ursache für die unterschiedliche Transportkapazität der geprüften Darmsegmente ist unklar. Es bleibt festzustellen, daß Jejunum und Ileum über unterschiedlich große Resorptionsflächen verfügen (17). Die höhere Transportkapazität des proximalen Jejuns steht teilweise im Einklang mit seiner größeren Resorptionsfläche.

Sicherlich ist aber die unterschiedliche Transportleistung nicht alleine mit dem Unterschied in der Größe der Resorptionsflächen von Jejunum und Ileum zu erklären, die im Verhältnis 2 : 1 stehen (17). Es ist daher denkbar, daß die Existenz eines spezifischen Translokationssystems am Jejunum für die wesentlich höhere Transportkapazität dieses Darmabschnittes mitverantwortlich ist.

Bei der Betrachtung von Aufnahme ins Gewebe und Durchtritt eines Stoffes ist ebenso von Interesse, in welcher Form dieser Stoff transportiert wird bzw. ob während des Durchtritts durch die Darmwand eine nennenswerte Biotransformation stattfindet.

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Analysen haben ergeben, daß Prunasin innerhalb von 120 min weder im proximalen Jejunum noch im terminalen Ileum metabolisch umgewandelt wird (vergl. Tab. 1 sowie Abb. 4). Somit kann im folgenden von einem Prunasin-Transfer gesprochen werden.

4.2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Prunasin ist der primäre Metabolit des cyanogenen Glycosids Amygdalin, das in den Kernen verschiedener Steinfrüchte (Pfirsich, Aprikose, Kirsche, Bittermandel etc.) vorkommt. Amygdalin selbst wird aus dem Gastrointestinaltrakt von Hund und Ratte kaum resorbiert (orale Bioverfügbarkeit ca. 2 %) (19), jedoch bereits im oberen Dünndarm der Ratte unter Abspaltung des terminalen Glucoserestes in Prunasin umgewandelt (25).

Diese hydrolytische Abspaltung des terminalen Glucoserestes sowie die Freisetzung von Cyanid soll, wie häufig in der Literatur beschrieben, ausschließlich durch unspezifische β -glucosidische Enzyme der mikrobiellen Darmflora erfolgen (3) (15) (16).

Neuere Untersuchungen von Strugala und Forth (28) deuten auf eine Zerteilung der hydrolytischen Vorgänge hin. Dabei erfolgt zunächst die Hydrolyse des terminalen Glucoserestes durch spezifische β -(1-6)-Glucosidase-Aktivitäten des oberen Dünndarmes selbst, während unspezifische β -glucosidische Enzyme der Darmflora eine vollständige Hydrolyse bis zum Benzaldehyd unter Freisetzung von Cyanid bewirken.

Da Amygdalin weitestgehend in Form seines primären Metaboliten Prunasin (orale Bioverfügbarkeit ca. 50 %) aus dem Verdauungstrakt in den Organismus aufgenommen wird (20), wurden Untersuchungen zum Studium des Durchtritts durch die Darmwand und der Aufnahme von Prunasin ins Gewebe durchgeführt.

4.3 Welche Rückschlüsse können aufgrund der in vitro Untersuchungen auf den Mechanismus des Prunasin-Transfers durch die Darmwand gezogen werden?

Die Untersuchungen zum Translokationsmechanismus von Prunasin legen die Vermutung nahe, daß es sich beim Transport von Prunasin durch die Darmwand im proximalen Jejunum nicht um einfache Diffusionsvorgänge handelt, sondern daß auch energieabhängige Transportmechanismen beteiligt sind. Dagegen haben sich für das terminale Ileum keinerlei Hinweise auf ein akkumulierendes Transportsystem ergeben.

4.3.1 Zur Konzentrationsabhängigkeit

Zur Beurteilung der Transportkinetik wurde der Prunasin-Transfer von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms}) in einem Konzentrationsbereich von 1 - 1000 $\mu\text{mol/l}$ geprüft. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Transportgeschwindigkeit für Prunasin im proximalen Jejunum pro cm und min mit steigenden Prunasin-Konzentrationen gegen einen Grenzwert konvergiert, d.h. der Transfer von Prunasin im Jejunum zeigt Sättigungs-Charakteristik im Sinne der Michaelis-Menten-Kinetik.

Durch die Lineartransformation nach Hanes (9) - wobei $[S]/V$ gegen $[S]$ aufgetragen wird -, konnte aus der Steigung $(1/V_T)$ sowie dem Schnittpunkt der Ordinate $[S_{0,5}]/V_T$ die maximale Transportgeschwindigkeit $V_T = 11,6 \times 10^{-6} \text{ mol} \times \text{cm}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ sowie die Halbsättigungskonstante $[S_{0,5}] = 4,6 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ abgeschätzt werden.

Dagegen verläuft der Transfer von Prunasin am terminalen Ileum in dem geprüften Konzentrationsbereich von 10 - 1000 $\mu\text{mol/l}$ proportional zur Angebotskonzentration.

4.3.2 Zur Natriumabhängigkeit

Unter der Annahme eines trägervermittelten Cotransportes für Prunasin durch die Darmwand wurde in einer weiteren Versuchsserie die Natriumkonzentration des Perfusionsmediums schrittweise reduziert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Natriumabhängigkeit haben ergeben, daß der Transfer von Prunasin (J_{ms}) durch die Darmwand am proximalen Jejunum natriumabhängig ist; d.h. reduziert man die Na^+ -Konzentration in der Perfusionslösung, vermindert sich der transepitheliale Transport zur Serosaseite.

Demgegenüber beobachtet man am terminalen Ileum eher eine leichte, wenn auch statistisch nicht signifikante Erhöhung des Prunasin-Transfers.

Mit anderen Worten heißt das, daß der Prunasin-Transfer im terminalen Ileum weitgehend unabhängig von der Natriumkonzentration im Inkubationsmedium verläuft.

Untersucht man gleichzeitig den Gehalt an Prunasin im Darmgewebe in Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration, zeigt sich lediglich bei der niedrigsten Na^+ -Konzentration (58 mmol/l) eine signifikante Erhöhung des Gehaltes an Prunasin im Jejunumgewebe um 130 %. Am terminalen Ileum erhöht sich bei erniedrigter Natriumkonzentration der Gehalt an Prunasin im Darmgewebe um 70 %.

Die Ursache für diese Steigerung ist noch unklar. Vergleicht man die Feuchtgewichte der Darmsegmente (g/cm), beobachtet man bei natriumarmen Versuchsbedingungen eine deutliche Reduzierung des Darmfeuchtgewichtes um etwa 40 % (Jejunum) bzw. 30 % (Ileum) gegenüber den Kontrollen. Diese Beobachtung könnte die Annahme nahelegen, daß die Abnahme des Wassergehaltes im Darmgewebe unter natriumarmen Bedingungen zu einer Erhöhung der Konzentration im Gewebe führt.

Andererseits ist in der Literatur beschrieben, daß hier das Phänomen des schlecht drainierten Raumes vorliegt und damit im Wassertransport kein Spüleffekt zu sehen ist (14). Das heißt, daß nach Blockierung der aktiven Aufnahme eines Stoffes und Fortbestehen diffusiver Prozesse ein schnellerer diffusiver Einstrom an der mucosalen Membran gegenüber einem weniger schnellen diffusiven Ausstrom an der basolateralen Membran besteht.

In diesem Zusammenhang konnte eine Veränderung des Intra- und Extrazellulärspaces nicht beobachtet werden (vergl. Tab. VII).

4.3.3

Zur Temperaturabhängigkeit

Versuche, bei denen die Temperaturen des Organbades von 37°C bis auf 7°C erniedrigt wurden, dienten zum Nachweis der Stoffwechselabhängigkeit des Transportes von Prunasin durch die Darmwand. Dabei hat sich gezeigt, daß am proximalen Jejunum der Transfer von Prunasin (J_{ms}) sowie der Gehalt im Gewebe (TC_m) ganz offensichtlich vom Energiestoffwechsel der Darmzelle abhängt.

Der errechnete Temperaturquotient Q_{10} für den jejunalen Transfer (J_{ms}) bei Absenkung der Temperatur von 37°C auf 27°C beträgt 3,4. Dies spricht gegen einen einfachen diffusiven Vorgang, da dessen Werte bei 1,0 bis 1,3 liegen (11) und unterstützt die Annahme, daß dem Transfer von Prunasin im Jejunum eine chemische Reaktion zugrunde liegt.

Eine Abnahme des Gehaltes im Gewebe (TC_m) um etwa 50 % wird bei Senkung der Temperatur auf 7°C beobachtet. Dieser Befund wird unterstützt durch die Resultate der Versuche zur Nettoverschiebung von Prunasin ohne initialen Konzentrationsgradienten. Diese Befunde zeigen, daß bei Reduktion der Temperatur auf 7°C das Jejunumgewebe weitgehend die Fähigkeit verliert, Prunasin im Darmepithel zu akkumulieren.

Demgegenüber erweist sich der Transfer von Prunasin (J_{sm}) sowie der Gehalt im Gewebe (TC_s) in umgekehrter Richtung als unabhängig von der Temperatur des Organbades.

Am terminalen Ileum ist der Transfer bzw. der Gehalt an Prunasin im Gewebe sowohl von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms} , TC_m) als auch in der umgekehrten Richtung (J_{sm} , TC_s) unabhängig von der Inkubationstemperatur.

Das heißt, es gibt keinerlei Hinweise auf einen energieabhängigen Transportmechanismus für Prunasin im terminalen Ileum.

Die im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit erstellten Arrhenius-Diagramme ermöglichen die präzisere Erfassung der energieabhängigen Transportprozesse durch die Darmwand (J_{ms} , J_{sm}) sowie der Aufnahme von Prunasin ins Darmgewebe (TC_m , TC_s). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisher dargestellten Befunden.

Es zeigt sich, daß die Geraden für den Transfer (J_{ms}) und die Aufnahme von Prunasin ins Darmgewebe (TC_m) des Jejunum spontan (jedoch bei unterschiedlichen Übergangstemperaturen) abknicken.

Nach Auffassung von Crozier (5) läßt sich der Knick in der Arrhenius-Geraden auf einen Wechsel in der "Schrittmacherreaktion" zurückführen, weil eine Änderung des limitierenden, geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes in der Reaktionskaskade stattfindet. Der Wechsel der Schrittmacherreaktion im Reaktionsablauf kann auch auf eine Phasenänderung im Membransystem zurückzuführen sein (13), d.h. auf Strukturveränderungen im resorbierenden Epithel.

Die Berechnung der Aktivierungsenergie nach der Gleichung von Arrhenius ergibt für die Resorptionsrichtung des Transfers im Jejunum einen Wert von $E = 22,5$ kcal/mol. Dieser Wert spricht für einen enzymkatalysierten Vorgang bzw. aktiven Transport und gegen einen physikalischen Vorgang, so wie er offensichtlich in der Sekretionsrichtung vorliegt. Die definierte Grenze zwischen physikalischen und enzymkatalysierten Vorgängen liegt bei etwa 4 kcal/mol (11). Der energetische Aufwand für die Aufnahme ins Jejunumgewebe (TC_m) entspricht dem Wert $E = 8,8$ kcal/mol.

Die entsprechenden Funktionen des Transfers (J_{sm}) und der Aufnahme ins Gewebe (TC_s) in umgekehrter Richtung verlaufen flacher und streng linear. Die hierbei ermittelten Aktivierungsenergien betragen etwa 1 kcal/mol; dies spricht für einen diffusiven Vorgang.

Ähnliche Aktivierungsenergien wurden auch für den Transport und die Aufnahme von Prunasin im Ileum ermittelt.

4.3.4 Zur Nettoverschiebung von Prunasin ohne initialen Konzentrationsgradienten

Die Untersuchungen zur Nettoverschiebung von Prunasin ohne initialen Konzentrationsgradienten (d.h. bei äquimolarem Angebot auf beiden Seiten des Darmpräparates) in Abhängigkeit von der Temperatur zeigen, daß am proximalen Jejunum bei 7°C offensichtlich die Fähigkeit abnimmt, Prunasin gegen einen Konzentrationsgradienten im Darmgewebe zu akkumulieren. Während man unter Kontrollbedingungen (37°C) eine Akkumulation auf etwa das 3,5-fache beobachtet, ist die Gewebeakkumulation bei 7°C auf das 2-fache reduziert.

Demgegenüber verzeichnet man am terminalen Ileum keinen unterschiedlichen Gehalt an Prunasin im Gewebe bei 37°C bzw. 7°C. Im Vergleich zum Jejunum besitzt das Ileum auch nicht die Fähigkeit Prunasin im Darmgewebe zu akkumulieren.

4.3.5 Zur Hemmwirkung von Prunasin auf den Transport von α -Methylglucose

Geht man von der Tatsache der Strukturähnlichkeit von Glukose und Prunasin aus und von der Annahme, daß beide Stoffe möglicherweise über einen gemeinsamen Carrier transportiert werden, so darf erwartet werden, daß Prunasin in der Lage ist, den Transport von Glucose im Darm zu inhibieren.

Die Versuche mit ^{14}C markierter α -Methyl-Glucose als Substrat und Prunasin als Hemmstoff zeigen eine signifikante Hemmung des Transfers (J_{ms}) der α -Methyl-Glucose um etwa 30 % in Gegenwart von Prunasin gegenüber den Kontrollen. Ebenso wird durch Prunasin die Aufnahme ins Gewebe (TC_m) gehemmt; bei der niedrigen α -Methyl-Glucose-Konzentration um ca. 80 % und bei der hohen Konzentration um ca. 45 %.

Diese Befunde dürfen als erste Hinweise dafür gewertet werden, daß das cyanogene Glukosid Prunasin mittels physiologischer Transporteinrichtungen (Glucose-Carrier) die Darmwand durchquert und in den Organismus gelangt. Um diese Vermutung jedoch zu untermauern, sind weitere Untersuchungen notwendig. Insbesondere wird zu prüfen sein, um welchen Typ der Hemmung (kompetitiv, nicht-kompetitiv) es sich bei der Interaktion zwischen α -Methyl-Glucose und Prunasin handelt. Als geeignete Methode zur Klärung des zugrundeliegenden Hemmtyps bietet sich die Gewebe-Akkumulationstechnik unter Verwendung sog. evertierter Darmringe an (4).

4.4 Schlußfolgerungen

Angesichts der vorliegenden Befunde kann folgendes über den Transfer-Mechanismus von Prunasin durch die Darmwand festgehalten werden:

Am proximalen Jejunum findet sich eine Akkumulation auf der Serosaseite mit einem S/M Quotienten von 1,5; sowie eine Akkumulation im Darmgewebe mit einem TC/M Quotienten von ebenfalls 1,5. Diese Daten sprechen für ein akkumulierendes Transportsystem.

Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit zeigen, daß mit steigender Prunasin-Konzentration die Transportgeschwindigkeit im Jejunum gegen einen Grenzwert konvergiert und damit Sättigungscharakteristik zeigt. Die Transportgeschwindigkeit wird also nicht von der Substrat-Konzentration, sondern von der Konzentration des Träger-Substrat-Komplexes bzw. von der Gesamtmenge der Trägermoleküle bestimmt.

Die Beeinflußbarkeit des Transfers sowie des Gehalts im Gewebe durch Temperaturänderung des Organbades bestätigen die Abhängigkeit vom Energiestoffwechsel der Darmzelle. Die Berechnung der Aktivierungsenergien E nach der Gleichung von Arrhenius (1) erhöht die Aussagekraft im Sinne eines Nachweises von aktiven Transportmechanismen; sowohl für den Transfer (J_{ms}) als auch für den Gehalt im Gewebe (TC_m) des Jejunum.

Die Ergebnisse der Natriumabhängigkeit zeigen einen verminderten transepithelialen Transport zur Serosaseite bei reduziertem Natriumgehalt.

Untersuchungen zur Hemmwirkung von Prunasin können als erste Hinweise gewertet werden, daß Prunasin - aufgrund der Strukturähnlichkeit von Prunasin mit Glucose - möglicherweise über den Glucose-Carrier transportiert wird.

Amygdalin und sein Metabolit Prunasin entsprechen chemisch gesehen Di- bzw. Monosacchariden. Es ist bekannt, daß Monosaccharide rasch durch ein spezifisches Transportsystem der Enterozyten resorbiert werden, hingegen Disaccharide wie Amygdalin erst resorbiert werden, nachdem die Hydrolyse durch am Bürstensaum der Darmwand lokalisierter Glucosidasen erfolgt ist.

Amygdalin (Disaccharid) zeigt daher nur eine geringe Bioverfügbarkeit gegenüber Prunasin (Monosaccharid), das nach oraler Applikation zu etwa 50 % bioverfügbar ist.

Die am terminalen Ileum erhobenen Befunde kennzeichnen diesen Darmabschnitt durch einen offensichtlich langsamen Prunasin-Transport von der Mucosa- zur Serosaseite mit einem S/M Quotienten wesentlich kleiner als 1 und einem TC/M Quotienten von etwa 1.

In diesem Darmabschnitt ist die Transportgeschwindigkeit proportional dem Substratangebot. Es gibt keinen Hinweis auf eine Sättigungskinetik. Ferner zeigt sich, daß der Prunasin-Transfer in diesem Darmabschnitt weitestgehend unabhängig von der Natrium-Konzentration und Temperatur der Inkubationslösung ist.

Hier wird also der Unterschied zwischen beiden Darmabschnitten im Prunasin-Transfer deutlich. Wenn Prunasin im Jejunum bevorzugt über das Glucose-Transportsystem läuft, dann steht dieser Substanz im Ileum kein vergleichbares Transportsystem zur Verfügung. Im Ileum kann Prunasin bestenfalls über ein Ausgleichs-Transportsystem zur Serosaseite gelangen. Zudem ist es bei der maximal durchführbaren Versuchsdauer von 2 Stunden nicht möglich, diesen Ausgleich annähernd zu erreichen (27). Im Gegensatz hierzu ist es im Jejunum aufgrund des akkumulierenden Transportsystems möglich, Prunasin gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, daß es sich beim Translokationsvorgang von Prunasin durch die Darmwand des proximalen Jejunums mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen aktiven, Carrier vermittelten Transportprozeß handelt, während der Transport im terminalen Ileum offensichtlich per diffusionem verläuft.

Die Beantwortung der Frage, ob und inwieweit Prunasin den im Bürstensaum der Darmzelle lokalisierten Glucose-Carrier benutzt, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten werden.

KAPITEL 5 - MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

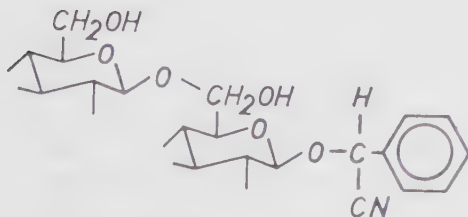
5.1.1 Versuchstiere

Weiblichen Wistar Ratten (200 - 240 g KG) der Süddeutschen Versuchstierfarm GmbH & Co KG, Tuttlingen wurde 16 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter (ALMA Ratten-Haltungsdiät H 1003 = Standard-Diät) der Firma Friedrich Botzenhardt KG, Kempten entzogen. Während dieser Zeit hatten die Tiere freien Zugang zum Trinkwasser.

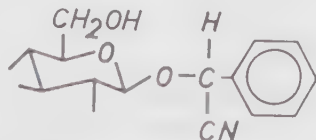
5.1.2 Substanzen

5.1.2.1 Prunasin

Prunasin (D-Mandelsäurenitril- β -D-Glucosid) Molekulargewicht: 295,3 Dalton, wurde von der Firma Sigma, Taufkirchen, in kristalliner Form bezogen.



Amygdalin
(D-Mandelsäurenitril- β -D-Gentiobiosid)



Prunasin
(D-Mandelsäurenitril- β -D-Glucosid)

Abb. 15

Strukturformeln von Amygdalin und Prunasin

5.1.2.2 Radionuclide

Folgende radioaktive Substanzen wurden von der Fa. New England Nuclear, Dreieich bezogen.

^{14}C α -Methyl-Glucose

Spezifische Aktivität: 0,1 mCi/ml
194,20 Dalton.

^{14}C Polyethylen-Glycol (PEG 4000)

Spezifische Aktivität: 0,55 mCi/g
Durchschnittliches Molekulargewicht von 4.000 Dalton.

^3H Mannit

Spezifische Aktivität: 50 mCi/ml
182,17 Dalton.

$^3\text{H}_2\text{O}$

Spezifische Aktivität: 1 mCi/ml
19 Dalton.

Alle anderen verwendeten Substanzen wiesen mindestens den Reinheitsgrad p.a. auf.

5.2.1 Inkubation isolierter, nicht durchbluteter Darmsäckchen nach der Methode von Wilson und Wiseman

Die Darmsegmente (Jejunum und Ileum) wurden in zwei verschiedenen Versuchsanordnungen eingesetzt (Abb. 16):

a) als evertierte Darmsegmente gemäß der Methode von Wilson und Wiseman (30) zur Messung der Nettobewegung von Prunasin von der Mucosa- zur Serosaseite (J_{ms}) sowie zur Bestimmung der Aufnahme von Prunasin ins Darmgewebe von der Mucosaseite (TC_m). Ferner dienten sie zur Bestimmung der Gleichgewichtseinstellung nach äquimolarem Angebot von Prunasin auf der Mucosa- und Serosaseite;

b) als nicht evertierte Darmsäckchen zur Messung der Nettobewegung von Prunasin in umgekehrter Richtung, d. h. von der Serosa- zur Mucosaseite (J_{sm}) sowie zur Bestimmung der Aufnahme von Prunasin ins Darmgewebe von der Serosaseite (TC_s).

Die Präparation der Darmsegmente erfolgte in Ethernarkose. Den Versuchstieren wurde von der Flexura duodenojejunalis nach distal das proximale Jejunum und von der Valvula ileocoecalis nach proximal das terminale Ileum entnommen. Sodann in eiskalter, Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2 ; V/V) gesättigter Tyrodelösung gespült und anschließend auf einen PVC-Stab ($\emptyset$ 3 mm) aufgezogen und umgestülpt (evertiert), so daß sich das Mucosaepithel außen und das Serosaepithel innen befand.

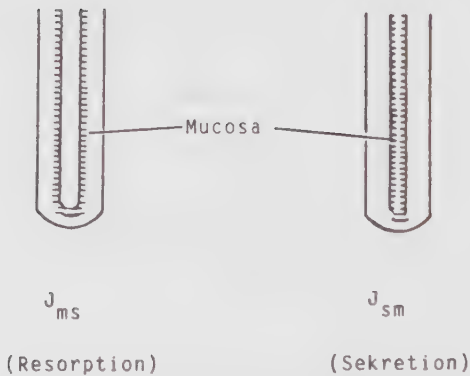
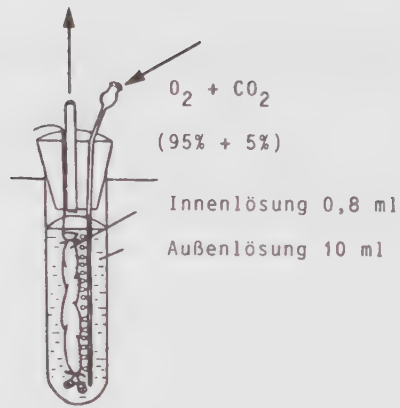


Abb. 16

Versuchsanordnung für evertierte und nicht evertierte Darm-
säckchen nach der Methode Wilson und Wiseman (30) sowie
schematische Darstellung der Transportrichtungen im Versuch

Die Darmsegmente wurden für die Verwendung als nicht evertierte Säckchen vor der Abtrennung vom Mesenterium mit physiologischer Kochsalzlösung freigespült.

Ein Ende wurde fest abgebunden und mit Raschig-Ringen (ca. 0,5 g) beschwert, um den Auftrieb der Darmsegmente im Inkubationsgefäß zu verhindern. Das andere Ende erhielt zunächst eine lockere Ligatur. Es wurden 0,8 ml Inkubationsflüssigkeit (Innenlösung) injiziert, und die Ligatur fest verschlossen. Anschließend erfolgte die Inkubation in 10 ml begaster Tyrodelösung (Außenlösung). Die Länge der Darmsäckchen betrug durchschnittlich 5 cm, bei nicht evertierten ca. 6 cm.

Entsprechend der jeweiligen Fragestellung wurde Prunasin entweder auf der Mucosaseite evertierter (J_{ms}) oder Serosaseite nicht evertierter (J_{sm}) Darmsäckchen angeboten und der Transfer durch die Darmwand zur jeweils anderen Seite bzw. der jeweilige Gehalt im Darmgewebe (TC_m , TC_s) bestimmt.

Die Inkubationszeiten, Temperaturen und Prunasininkonzentrationen sind den entsprechenden graphischen Abbildungen und Tabellen zu entnehmen.

5.2.2 Aufarbeitung der Darmsegmente aus der Versuchsanordnung nach Wilson und Wiseman

Nach Versuchsende wurde die Länge der Darmsäckchen (hängend und vor Entfernung der Raschig-Ringe) bestimmt sowie das Volumen der Innenlösung gravimetrisch ermittelt. Zur Messung der im Darmgewebe akkumulierten Prunasinmenge wurden die Darmsegmente der Länge nach aufgeschnitten und durch Abtupfen mit Filterpapier sorgfältig von Flüssigkeit und Schleim befreit.

Sodann wurden die Darmsegmente gewogen, mit 50 %-iger Acetonitrillösung in H_2O (v/v) im Verhältnis 1 : 4 versetzt und mittels eines Ultraturrax (Fa. Janke & Kunkel) zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenat bei 6000 U/min 25 min lang in einer Minifuge (Fa. Heraeus Christ) zentrifugiert.

Eine definierte Menge des Überstandes wurde mit 0,33 N Perchlorsäure [jeweils 1/10 der definierten Menge des Überstandes] versetzt und für 15 bis 20 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde mit der Eppendorffzentrifuge (Modell: 5413) drei Minuten lang scharf abzentrifugiert, und aus dem Überstand die Prunasin-Konzentrationen mit Hilfe der HPLC-Technik bestimmt.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß nach der oben beschriebenen Aufarbeitungsprozedur der Darmsegmente mehr als 99 % einer definierten Prunasin-Menge wiedergefunden wurden.

5.2.3 Durchströmung isolierter, nicht durchbluteter Darmsegmente nach der Methode von Fischer und Parsons

5.2.3.1 Präparation

Die Präparation der Darmsegmente (prox.Jejunum und term. Ileum), die durchschnittlich 10 cm lang waren, erfolgte wie unter Punkt 5.2.1 beschrieben. An beiden Enden der Darmsegmente wurden Glasröhrchen mit Schliffansätzen eingebunden und anschließend mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung durchspült. Erst danach wurden die Darmsegmente von der Blutversorgung abgetrennt und in die Durchströmungsanordnung nach Fisher und Parsons modifiziert durch Richter und Strugala (21) eingehängt.

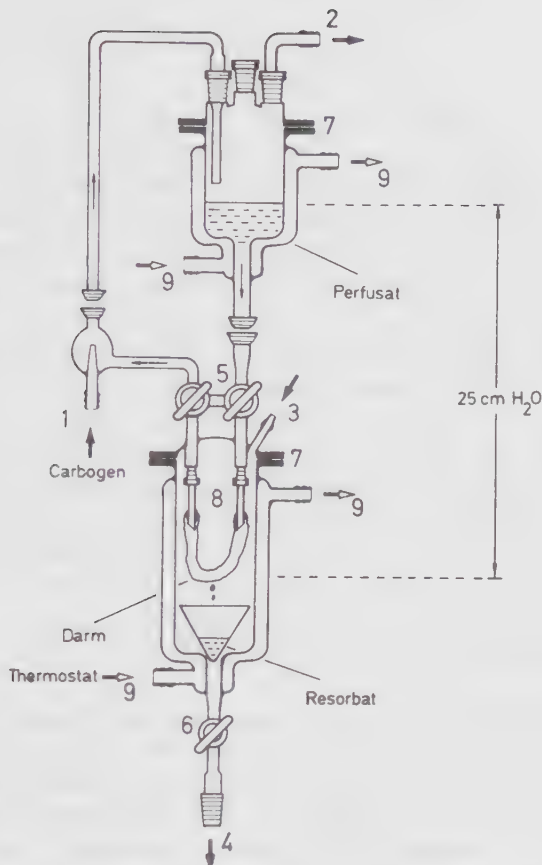


Abb. 17

GANZ-GLAS-PERFUSATOR nach Richter und Strugala (21)

- 1: Zufuhr von Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) über Glasolive
- 2,3: Überleitung des Carbogens von der oberen Perfusionskammer [2] über einen Teflonschlauch (nicht eingezeichnet) in die untere Kammer [3]
- 4: Ableitung des Carbogens aus der unteren Perfusionskammer
- 5: Dreiwegehähne aus Teflon (Perfusions-Shunt)
- 6: Zweiwegehahn aus Teflon
- 7: Planschliffverbindung zum Verschluß der Kammern
- 8: Glaskanülen
- 9: Nicht ausgefüllte Pfeile kennzeichnen den Weg des thermostatregulierten Wasserkreislaufs. Schlauchverbindungen sind nicht eingezeichnet.

5.2.3.2 Perfusion

Die Durchströmung der isolierten, nicht durchbluteten Darmabschnitte erfolgte in einer von Richter und Strugala (21) entwickelten Ganz-Glas-Apparatur (Abb. 17). Damit sollte sichergestellt werden, daß während der zweistündigen Perfusion keine undefinierbaren Verluste auftreten.

Die beiden Gummistopfen für den Verschluß der oberen und unteren Perfusionskammer wurden durch Glasschliffverbindungen ersetzt. Durch zwei Dreiwegehähne wurde zusätzlich die Möglichkeit geschaffen, die Perfusionslösung (50 ml mit 15,0 mmol/l Glucose) vor Versuchsbeginn rezirkulieren zu lassen, um eine Erwärmung auf 37°C und eine optimale Sauerstoffanreicherung zu erzielen. Die Perfusionslösung wurde dabei durch das über eine Glasolive zugeführte Gasgemisch (Carbogen) (95 % O₂, 5 % CO₂) belüftet und in Zirkulation gehalten.

Die Zusammensetzung der Perfusionslösung (Tyrodelösung) war identisch mit derjenigen, die auch bei der everted sac - Technik eingesetzt wurde (vergl. Punkt 5.2.5.1). Der pH-Wert der Perfusionslösung betrug 7,2 - 7,4 und blieb während der gesamten Versuchsdauer von 2 Stunden konstant.

Die untere Kammer enthielt ein Spitzglas zum Auffangen der vom Darm resorbierten Flüssigkeit (Resorbat) und wurde mit einem wassergesättigtem Filterpapierstreifen feucht gehalten. Nach Einhängen der Darmsegmente und Verschluß der unteren Kammer wurde die Perfusionslösung durch den Darm geleitet. Der Perfusionsdruck betrug 25 cm Wassersäule, die Perfusionsrate 55 - 65 ml/min. Angefeuchtetes, erwärmtes Carbogen wurde jetzt über die Schlauchverbindungen (Teflon, $\varnothing_a = 7$ mm, $\varnothing_1 = 5$ mm, ca. 40 cm lang) von der oberen in die untere Kammer (siehe Abb. 17) geleitet. Damit wird eine ausreichende Sauerstoffversorgung und Befeuchtung des Darmes auch von außen gewährleistet.

Nach Versuchsende wurde die Länge (hängend) sowie das Darmgewicht der Darmsegmente gemessen; das Volumen des Resorbats gravimetrisch bestimmt; Glucose und Elektrolyte (Na^+ , K^+ , Ca^{++}) als Vitalitätskriterien bestimmt und anschließend die Konzentration an Prunasin mittels der HPLC-Technik gemessen.

Die Aufarbeitung der Darmabschnitte erfolgte in gleicher Weise wie bereits unter Punkt 5.2.2 beschrieben.

5.2.4 Beurteilung der Leistungsfähigkeit isolierter, nicht durchbluteter Darmsegmente in vitro

5.2.4.1 Evertierte und nicht evertierte Darmsegmente nach der Methode von Wilson und Wiseman

Die Transportleistung der nach Wilson und Wiseman (30) präparierten Darmabschnitte läßt sich vor allem durch die Errichtung eines Konzentrationsgradienten für Glucose zwischen der Mucosa- und Serosaseite beurteilen. Im Gegensatz zu den isolierten, nicht durchbluteten Darmsegmenten nach der Methode Fisher und Parsons, kann die Netto- Wasser- verschiebung bei den Darmsäckchen nicht als geeignetes Maß herangezogen werden, da die Wasserbewegung vom variablen hydrostatischen Druck im Inneren der Darmsäckchen abhängig ist.

5.2.4.2 Isoliert durchströmte Darmsegmente nach der Methode von Fisher und Parsons

Für die Überprüfung der physiologischen Leistungsfähigkeit isolierter, durchströmter Darmabschnitte nach der Methode von Fisher und Parsons (6) können als verlässliche Beurteilungskriterien herangezogen werden:

- a) der Bergauftransport der Glucose sowie
- b) die Netto- Wasserverschiebung - als Folge des aktiven Natriumtransportes - von der Mucosa- zur Serosaseite.

Der Bergauftransport der Glucose findet seinen Ausdruck im S/M Quotienten. Dieser errechnet sich auf der Basis der Glucose-Konzentration auf der Serosa-Seite (S) versus der Glucose-Konzentration auf der Mucosa-Seite (M).

Im Jejunum beobachtet man nach 120 min Versuchszeit einen S/M Quotienten von etwa 3, während er im terminalen Ileum etwa 0,5 beträgt.

5.2.5 Inkubationsmedien

5.2.5.1 Tyrodelösung

Die Inkubation der Darmsegmente nach der Methode Fisher und Parsons (6) sowie Wilson und Wiseman (30) erfolgte in einer Tyrodelösung folgender Zusammensetzung:

NaCl 137; KCl 2,7; $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 1,4;
 $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,5; NaHCO_3 12; NaH_2PO_4 0,4;
Glucosemonohydrat 15,0 mmol/l.

Während der gesamten Versuchsdauer wurde die Inkubationslösung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂; V/V) begast. Der pH-Wert der Lösung lag zwischen 7,2 und 7,4.

Bei Experimenten mit Na⁺-armer Tyrode wurde Natriumchlorid durch Cholinchlorid in äquimolarem Verhältnis ersetzt.

In den Versuchen mit glucosefreier Tyrode wurde der Energieträger Glucose durch Dihydroxyaceton ersetzt.

5.3 Analytische Methoden

5.3.1 Glucosebestimmung

Die Glucosebestimmung erfolgte enzymatisch mit Hilfe der Glucose-Oxydase (GOD), der Peroxydase (POD) sowie dem Chromogen ABTS = 2.2'-Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure-(6)]-diammoniumsalz.

(Biochemica-Test-Combination, GOD-Perid^(R) Methode der Firma Boehringer Mannheim)

Die photometrische Messung wurde mit einem Eppendorf-Photometer 1101 M bei 578 nm in einer Absaugküvette (d = 1 cm) durchgeführt.

5.3.2 Elektrolytbestimmung

Die Messung der Elektrolyte Na⁺, K⁺ und Ca⁺⁺ wurde simultan mit dem Eppendorf Flammenphotometer (Modell FCM 6341) durchgeführt.

Jeweils 50 µl von Resorbat, Perfusat wurden mit 2,5 ml Lithiumlösung versetzt und zur Messung gebracht.

5.3.3 pH-Wert Bestimmung

Die Bestimmung der pH-Werte wurde mit dem pH-Meter E 512 der Firma Metrohm AG, Schweiz vorgenommen. Zum Eichen der Glaselektrode wurden Eichpuffer der Firma E. Merck, Darmstadt benutzt. Die pH-Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

5.3.4 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Prunasin wurde in den Ultrafiltraten von Perfusat, Resorbat und Darmhomogenat in Anlehnung an die Methode von Rauws et al. (18) mit Hilfe der HPLC-Technik bestimmt.

Bausteine der HPLC waren

- ein HEWLETT-Packard 3390 A Integrator
- ein Spectrophotometer der Firma GYNKOTEK sowie
- eine High-Precision-Pump, Model 300 B

Die Trennung erfolgte mit einer RP C-18 Säule (12,5 cm Länge; 4,6 mm Ø; Partikelgröße des Sorbens 5 µ; Hersteller Fa. GynkoteK, München) und einer Vorsäule mit groberem RP C-18 Material (Korngröße 30 - 44 µ; Hersteller Fa. Macherey-Nagel + Co, Düren).

Als Elutionsmittel diente 15 %-iges Acetonitril in H₂O (v/v). Die Detektion erfolgte bei 215 nm; Fluß: 1,0 ml/min. Das Einspritzvolumen betrug 20 µl, das mittels einer 20 µl Schleife (Überfüllungstechnik) stets exakt dosiert wurde.

Die Retentionszeiten von Prunasin betrugen unter den oben angeführten Analysebedingungen $5.89 \pm 0,02$ min.

Die Prunasin-Konzentrationen in den Ultrafiltraten Perfusat, Resorbat und Darmhomogenat wurden über das Integral der Fläche der entsprechenden Peaks in Bezug auf den Prunasin-Standard errechnet.

In Vorversuchen wurde die Wiederauffindungsrate von Prunasin aus dem Darmgewebe ermittelt. Dabei zeigte sich, daß mit der unter Punkt 5.2.2 beschriebenen Aufarbeitungsprozedur mehr als 99 % einer definierten eingesetzten Prunasin-Menge hochdruckflüssigkeitschromatographisch eluiert werden konnten.

5.3.5 Messung der Radioaktivität

Die Messung der ^3H - bzw. ^{14}C -Radioaktivität wurde mit dem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Packard, Modell 3385) unter Verwendung des Szintillationscocktails 808 E (Fa. Riedel-de-Haën, Seelze) auf Pseudocumol-Basis folgender Zusammensetzung durchgeführt.

Zusammensetzung des Szintillationscocktail 808 E ad 1000 ml:
8,3 g PPO; 0,83 g POPOP; 650 ml Pseudocumol; 200 ml Triton x - 100; 150 ml Methanol.

Jeweils 0,1 ml der zu messenden Probe (Perfusat, Resorbat) wurde in Kunststoffbehälter der Firma Zinsser, München gegeben und 10 ml Szintillationscocktail zugesetzt.

Zur Messung der ^3H - bzw. ^{14}C -Aktivität im Darmgewebe wurde ein etwa 100 mg schweres Darmstück aus der Mitte des Darmsegmentes entnommen, mit 0,5 ml Gewebelöser (Tetraethylammoniumhydroxyd-20 % in H_2O , (Fa. Riedel-de-Haën) versetzt und 2 - 4 Stunden lang bei 60°C in verschraubbaren Reagenzgläsern solubilisiert. Anschließend wurde das Solubilisat mit 10 ml Szintillationscocktail aufgefüllt und zur Messung gebracht.

Quenchkorrektur erfolgte mit Hilfe der Externen-Standard-Methode.

5.3.6 Messung des Intra- und Extrazellulärraums

Zur Prüfung der Frage, ob die Reduktion der Na^+ -Konzentration im Perfusat isoliert durchströmter Darmsegmente (Fisher und Parsons) bzw. die Erniedrigung der Temperatur des Organbades evertierter Darmsäckchen (Wilson und Wiseman) Einfluß auf den Intra- und Extrazellulärraum besitzen, wurden diese Räume mit Hilfe der Doppelmarkierungs-Isotopentechnik bestimmt. Hierzu wurde Tritium (schweres Wasser) sowie ^{14}C -Polyethylglycol-4000 (^{14}C -PEG) eingesetzt.

Die Bestimmung des Intra- und Extrazellulärraums mit Hilfe der Isotopentechnik (DOPPELMARKIERUNG) beruht auf der Grundlage, daß sich ^{14}C - PEG 4000 nur extrazellulär anreichert, $^3\text{H}_2\text{O}$ sich dagegen auf beide Räume verteilt (intra- und extrazellulär). Die Differenz von Gesamt- und Extrazellulärverteilung ergibt die Intrazellulärverteilung.

5.3.6.1 Berechnung

Gesamtverteilung

$$\frac{\text{DPM}_{3\text{H}} \quad (\text{G})}{\text{DPM}_{3\text{H}} \quad (\text{P}) \times \text{EINWAAGE}}$$

Extrazellulärverteilung

$$\frac{\text{DPM}_{14\text{C}} \quad (\text{G})}{\text{DPM}_{14\text{C}} \quad (\text{P}) \times \text{EINWAAGE}}$$

Intrazellulärverteilung

$$\frac{\text{DPM}_{3\text{H}} \quad (\text{G})}{\text{DPM}_{3\text{H}} \quad (\text{P}) \times \text{EINWAAGE}} - \frac{\text{DPM}_{14\text{C}} \quad (\text{G})}{\text{DPM}_{14\text{C}} \quad (\text{P}) \times \text{EINWAAGE}}$$

Wie aus Tabelle VI (Anhang) hervorgeht, unterscheiden sich die Verteilungsräume der beiden geprüften Dünndarmabschnitte (Jejunum, Ileum) bei der Temperaturveränderung nicht signifikant voneinander. Ebenso beobachtet man keinerlei Einfluß der Natrium-Konzentration auf den Intra- bzw. Extrazellulär-raum des Darmgewebes (siehe hierzu Tab. VII im Anhang).

5.3.7 Statistische Methoden

Die in den Tabellen aufgeführten Daten geben den Mittelwert ($\bar{x}$) aus n Einzelwerten sowie den mittleren Fehler der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$) an. Für die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde der t-Test nach Student (29) herangezogen.

5.3.8 Bedeutung verwendeter Kürzel

- J_{ms} : Transfer in Resorptionsrichtung bei Substanzangebot auf der Mucosaseite
- J_{sm} : Transfer in Sekretionsrichtung bei Substanzangebot auf der Serosaseite
- TC_m : Aufnahme ins Gewebe bei Substanzangebot auf der Mucosaseite
- TC_s : Aufnahme ins Gewebe bei Substanzangebot auf der Serosaseite
- $Q_{S/M}$: Quotient der Substanzkonzentrationen auf der Serosa- und Mucosaseite
- $Q_{TC/M}$: Quotient des Gehaltes im Gewebe und der Substanzkonzentration auf der Mucosaseite
- $Q_{TC/S}$: Quotient des Gehaltes im Gewebe und der Substanzkonzentration auf der Serosaseite
- $Q_{10} = \frac{k(T + 10)}{k_T}$

- k_T : Transportgeschwindigkeit bei Temperatur T
- $k_{(T+10)}$: Transportgeschwindigkeit bei Temperatur T + 10
- M: Mucosaseite
- S: Serosaseite
- TC: Darmgewebe
- $\varnothing_a$: Durchmesser außen
- $\varnothing_i$: Durchmesser innen

KAPITEL 6 - LITERATUR-VERZEICHNIS

1. **ARRHENIUS, S.A. (1889)**
Über die Geschwindigkeit bei der Inversion von
Rohrzucker durch Säuren
Z. phys. Chem. 4: 226-248
2. **BRAICO, K. T., HUMBERT, J. R., TERPLAN, K. L.,
LEHOTAY, J. M. (1979)**
Laetrile intoxication
New Engl. J. Med. 300
3. **CARTER, J. H., MCLAFFERTY, M. A., GOLDMAN, P. (1980)**
Role of the gastrointestinal microflora in
amygdalin (Laetrile) - induced cyanide toxicity
Biochem. Pharmacol., 29: 301-304
4. **CRANE, R.K., MANDELSTAM, P. (1960)**
The active transport of sugars by various
preparations of hamster intestine
Biochim. Biophys. Acta, 45: 460-476
5. **CROZIER, W. J. in: (1964)**
Enzyme kinetics (optimum pH, temperature and
activation energy) chap. IV (E.A. Davis)
Comprehensive Biochemistry
(Florkin, M. and Stotz, E.H. Eds.)
Elsevier Publishing Company
Amsterdam, London, New York
6. **FISHER, R.B., PARSONS, D.S. (1949)**
A preparation of surviving rat small intestine for
the study of absorption
J. Physiol. (Lond.) 110: 36-46

7. FORTH, W., RUMMEL, W. (1969)
Intestinale Resorption von Herzglykosiden in vitro
und in vivo.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 262: 53-72
8. FORTH, W., RUMMEL, W. (1975)
Gastrointestinal absorption of heavy metals.
In: Pharmacology of intestinal absorption:
Gastrointestinal absorption of drugs.
Eds., W. Forth and W. Rummel. Oxford, :
Pergamon Press IEPT sect. 39B, vol. II
9. HANES, C.S. (1932)
Studies on plant amylases
I. The effect of starch concentration upon the
velocity of hydrolysis by the amylase of germinated
barley
Biochem. J. 26: 1406-1421
10. HENNING, C.H., BECKER, G., FORTH, W. (1982)
Movement of thallium - ions across the epithelium
of intestinal segments in vitro of rats
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321: 157-163
11. HÜFER, M. (1977)
Transport durch biologische Membranen
Verlag Chemie Weinheim - New York
12. KOMP, B., FORTH, W. (1980)
Transfer across mucosal epithelium, tissue content
and metabolic fate of ^{125}I - (Iodate-Sodium) on
isolated everted segments of rat small intestine.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311: 273-284

13. KUMAMOTO, J., RAISON, J. K., LYONS, J. M. (1971)
 Temperature "breaks" in arrhenius plots:
 A thermodynamic consequence of a phase change
 J. theor. Biol. 31: 47-51

14. LAUTERBACH, F. (1977)
 Passive permeabilities of luminal and basolateral
 membranes in the isolated mucosal epithelium of
 guinea pig small intestine
 Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297: 201-212

15. MOERTEL, C.G., AMES, M.M., KOVACH, J.S., MAYER, R.P.,
 RUBIN, J.R., TINKER, J.H. (1981)
 A pharmacologic and toxicologic study of amygdalin
 J. Am. Med. Ass. 245: 591 - 594

16. NEWMARK, J, BRADY, R. O., GRIMLEY, Ph. M., GAL, A. E.,
 WALLER, S. G., THISTLETHWAITE, R. (1981)
 Amygdalin (Laetrile) and prunasin β -glucosidases:
 distribution in germ-free rat and in human tumor
 tissue
 Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 6513-6516

17. PERMEZEL, N. C., WEBLING, D. D'A. (1971)
 The length and mucosal surface area of the small
 and large gut in young rats
 J. Anat. 108: 295 - 296

18. RAUWS, A. G., GRAMBERG, L. G. OLLING, M. (1982)
 Determination of amygdalin and its major metabolite
 prunasin in plasma and urine by high pressure
 liquid chromatography
 Pharmaceutisch Weekblad Scientific Editon, 4:
 172-175

19. RAUWS, A. G., OLLING M., TIMMERMAN, A. (1982)
The pharmacokinetics of amygdalin
Arch. Toxicol. 49: 311-319 (1982)
20. RAUWS, A.G., OLLING, M., TIMMERMAN, A. (1982-83)
The pharmacokinetics of prunasin, a metabolite of amygdalin
J. Toxicol.: Clin. Toxicol., 19, 851 - 856
21. RICHTER, E., STRUGALA, G.J. (1985)
All-glass perfusator for investigations on intestinal transport and metabolism of foreign compounds 'in vitro'
J. Pharmacol. Methods, in press
22. RUMMEL, W., STUPP, HF. (1960)
Der Einfluß von Kalium und Calcium auf die Salz-, Glucose- und Wasserresorption des isolierten Dünndarmes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol. 240: 79-82
23. SMITH, R. L. (1971)
A symposium on mechanisms of toxicity in:
Ed. W. N. Aldridge, 235
Macmillan, New York
24. STAHL, R., STRUGALA, G.J., FORTH, W. (1984)
Transfer of prunasin in the rat intestine in vitro
Gastroenterologie Clinique et Biologique 8, 872
25. STRUGALA, G., RAUWS, A. G. (1982)
Metabolic transformation of amygdalin into prunasin in rat intestine in vitro
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321 (R 33)

26. STRUGALA, G.J., ELBERS, R. (1984)
Metabolism of amygdalin and prunasin in the
isolated perfused rat liver
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 325 (R 23)
27. STRUGALA, G.J., FORTH, W. (1984)
Effect of lidocaine on in vitro absorption of
glucose in jejunal and ileal segments of the rat
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 326: 283 -
285
28. STRUGALA, G.J., FORTH, W. (1985)
Hydrolysis of amygdalin in the small intestine
of the rat
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
328 (R 30)
29. WEBER, E. (1972)
Grundriß der biologischen Statistik
7. Auflage, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart
30. WILSON, T.H., WISEMAN, G. (1954)
The use of sacs of everted small intestine for the
study transference of substance from the mucosal
to the serosal surface
J. Physiol. (Lond.) 123: 116-125

KAPITEL 7 - TABELLEN

Tabelle I

Transfer von PRUNASIN durch die Darmwand an isolierten, nicht durchbluteten Darmsegmenten von Jejunum und Ileum - KONZENTRATIONSBÄHNGIGKEIT

Methode: Fisher und Parsons (6) - Versuchsdauer: 120 min - Temperatur: 37°C
 Glucosekonzentration zu Versuchsbeginn: 15,0 $\mu\text{mol/ml}$
 Am Versuchsende wurde die transportierte Menge an Prunasin in $\text{pmol/cm} \times \text{min}$ bestimmt.
 Die Zahlenangaben entsprechen Mittelwerten aus 3 - 8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

JEJUNUM (J_{ms})

Prun.-Konz. [S] (mol/l)	Anzahl (n)	Volumen Serosafl. (ml)	Feuchtgewicht d. Darmgewebes (g)	Darmlänge (cm)	Prun.-Konz. Serosafl. ($\mu\text{mol/l}$)	Transport- geschwind. ($\text{pmol/cm} \cdot \text{min}$)	[S]/v	Q = S M
1×10^{-6}	(4)	$2,37 \pm 0,16$	$0,466 \pm 0,033$	$9,20 \pm 0,26$	$1,51 \pm 0,15$	$3,21 \pm 0,33$	$3,33 \times 10^{-7}$	$1,85 \pm 0,08$
1×10^{-5}	(8)	$2,78 \pm 0,19$	$0,543 \pm 0,030$	$9,36 \pm 0,28$	$14,68 \pm 1,73$	$36,27 \pm 4,59$	$2,77 \times 10^{-7}$	$1,89 \pm 0,24$
5×10^{-5}	(6)	$1,92 \pm 0,15$	$0,381 \pm 0,013$	$8,58 \pm 0,17$	$62,03 \pm 3,39$	$115,81 \pm 11,47$	$4,31 \times 10^{-7}$	$1,34 \pm 0,07$
$7,5 \times 10^{-5}$	(5)	$2,03 \pm 0,13$	$0,389 \pm 0,013$	$8,54 \pm 0,24$	$115,54 \pm 6,52$	$231,95 \pm 25,56$	$3,26 \times 10^{-7}$	$1,58 \pm 0,11$
1×10^{-4}	(7)	$1,87 \pm 0,12$	$0,518 \pm 0,045$	$8,54 \pm 0,26$	$189,67 \pm 18,64$	$325,40 \pm 17,73$	$2,99 \times 10^{-7}$	$1,89 \pm 0,20$
2×10^{-4}	(6)	$2,10 \pm 0,17$	$0,387 \pm 0,013$	$8,48 \pm 0,24$	$227,08 \pm 22,64$	$549,57 \pm 74,57$	$3,63 \times 10^{-7}$	$1,02 \pm 0,11$
1×10^{-3}	(4)	$1,66 \pm 0,15$	$0,509 \pm 0,063$	$9,58 \pm 0,47$	$732,78 \pm 47,68$	$1048,21 \pm 57,49$	$9,54 \times 10^{-7}$	$1,05 \pm 0,06$

Tabelle I (Fortsetzung)

ILEUM (J_{ms})

Prun.-Konz. [S] (mol/l)	Anzahl (n)	Volumen Serosafl. (ml)	Feuchtgewicht d. Darmgewebes (g)	Darmlänge (cm)	Prun.-Konz. Serosafl. (μ mol/l)	Transport- geschwind. (μ mol/cm $\cdot$ min)	Q = S M
1×10^{-5}	(5)	0,85 $\pm$ 0,19	0,546 $\pm$ 0,023	9,26 $\pm$ 0,31	1,31 $\pm$ 0,18	0,88 $\pm$ 0,11	0,11 $\pm$ 0,02
$1,6 \times 10^{-5}$	(3)	1,12 $\pm$ 0,10	0,510 $\pm$ 0,025	9,37 $\pm$ 0,47	1,54 $\pm$ 0,25	1,58 $\pm$ 0,34	0,10 $\pm$ 0,02
5×10^{-5}	(5)	0,89 $\pm$ 0,09	0,369 $\pm$ 0,025	8,78 $\pm$ 0,33	5,07 $\pm$ 0,40	4,53 $\pm$ 0,23	0,11 $\pm$ 0,01
1×10^{-4}	(4)	0,65 $\pm$ 0,06	0,544 $\pm$ 0,072	8,25 $\pm$ 0,16	20,84 $\pm$ 3,58	13,69 $\pm$ 2,67	0,19 $\pm$ 0,04
2×10^{-4}	(5)	0,81 $\pm$ 0,06	0,402 $\pm$ 0,021	8,94 $\pm$ 0,32	27,27 $\pm$ 6,52	20,05 $\pm$ 5,01	0,11 $\pm$ 0,02
1×10^{-3}	(6)	0,90 $\pm$ 0,15	0,586 $\pm$ 0,026	10,90 $\pm$ 0,70	132,64 $\pm$ 33,27	89,69 $\pm$ 22,47	0,13 $\pm$ 0,03

Tabelle II

Transfer und Gehalt von PRUNASIN im Gewebe an isolierten, nicht durchbluteten Darmsegmenten des Jejunum und Ileum - NATRIUMABHÄNGIGKEIT

Methode: Fisher und Parsons (6) - Versuchsdauer: 120 min - Temperatur: 37°C
 Prunasinkonzentration zu Beginn des Versuchs: 10^{-4} mol/l; Prunasinangebot: Mucosaseite.
 Glucosekonzentration zu Versuchsbeginn: 15,0 μ mol/ml

Die Zahlenangaben entsprechen Mittelwerten aus 4 - 7 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

JEJUNUM

Na ⁺ -Konz. (mmol/l)	Volumen der Serosafl. (ml)	Feuchtgewicht d. Darmgewebes (g)	Darmlänge (cm)	Feuchtgewicht (g/cm)	Prunasin-Konz. d. Serosafl. (μ mol/l)	Transfer (J_{pr}) $\frac{v}{v}$ (μ mol/cm x min)	Gehalt (Gewebe) (TC) m (nmol/g FG)	Glucose-Konz. d. Serosafl. (μ mol/ml)	K ⁺ der Serosafl. mmol/g
150	1,87 $\pm$ 0,12 (7)	0,518 $\pm$ 0,045 (7)	8,54 $\pm$ 0,26 (7)	0,061 $\pm$ 0,005 (7)	189,67 $\pm$ 18,64 (7)	335,40 $\pm$ 17,73 (7)	109,49 $\pm$ 12,50 (6)	41,66 $\pm$ 4,16 (7)	7,04 $\pm$ 0,32 (6)
115	2,87 $\pm$ 0,32 (6)	0,573 $\pm$ 0,008 (6)	9,08 $\pm$ 0,32 (6)	0,063 $\pm$ 0,003 (6)	121,32 $\pm$ 8,55 (6)	322,64 $\pm$ 26,42 (6)	93,31 $\pm$ 6,64 (4)	30,97 $\pm$ 2,02 (6)	9,00 $\pm$ 1,07 (6)
80	2,30 $\pm$ 0,28 (6)	0,486 $\pm$ 0,028 (6)	10,23 $\pm$ 0,26 (6)	0,047 $\pm$ 0,002 (6)	108,18 $\pm$ 3,51 (6)	202,56 $\pm$ 26,88 (6)	128,78 $\pm$ 24,54 (6)	29,48 $\pm$ 0,90 (6)	7,49 $\pm$ 0,78 (6)
58	0,54 $\pm$ 0,12 (6)	0,324 $\pm$ 0,020 (6)	8,77 $\pm$ 0,26 (6)	0,037 $\pm$ 0,002 (6)	65,89 $\pm$ 3,79 (6)	45,60 $\pm$ 13,39 (6)	250,76 $\pm$ 15,95 (6)	11,71 $\pm$ 0,53 (6)	* n.d. wegen zu geringen Volumens

* n.d. = not detected

Tabelle II (Fortsetzung)

ILEUM

Na ⁺ -Konz. (mmol/l)	Volumen der Serosafl. (ml)	Feuchtgewicht d. Darmgewebes (g)	Darmlänge (cm)	Feuchtgewicht (g/cm)	Prunasin-Konz. d. Serosafl. (μ mol/l)	Transfer (J_{ms}) v (μ mol/cm x min)	Gehalt (Gewebe) (TC _m) (nmol/g TG)	Glucose-Konz. d. Serosafl. (μ mol/ml)	K ⁺ der Serosafl. mmol/g
150	0,65 ± 0,06 (6)	0,544 ± 0,072 (6)	8,25 ± 0,16 (6)	0,066 ± 0,009 (6)	20,84 ± 3,58 (5)	13,69 ± 2,67 (5)	84,01 ± 8,14 (6)	1,74 ± 0,16 (5)	2,41 ± 0,44 (6)
115	1,02 ± 0,11 (6)	0,624 ± 0,045 (6)	10,40 ± 0,57 (6)	0,060 ± 0,004 (6)	27,99 ± 4,26 (6)	22,07 ± 2,83 (6)	84,80 ± 11,20 (6)	1,30 ± 0,31 (6)	2,24 ± 0,38 (6)
80	1,17 ± 0,26 (6)	0,450 ± 0,038 (6)	9,55 ± 0,42 (6)	0,047 ± 0,003 (6)	25,48 ± 2,24 (6)	25,09 ± 4,51 (6)	136,65 ± 17,42 (6)	1,48 ± 0,33 (6)	4,05 ± 0,53 (6)
58	1,02 ± 0,11 (6)	0,452 ± 0,040 (6)	9,75 ± 0,51 (6)	0,046 ± 0,002 (6)	25,37 ± 4,22 (6)	23,78 ± 6,36 (6)	139,91 ± 14,19 (6)	1,80 ± 0,50 (6)	5,00 ± 0,80 (6)

Tabelle III

Transfer und Gehalt von PRUNASIN im Gewebe an evertierten und nicht evertierten Jejunumsegmenten /
Ileumsegmenten - TEMPERATURABHÄNGIGKEIT

Methode: Wilson und Wiseman (30) - Versuchsdauer: 120 min

Zu Beginn des Versuches betrug die Prunasinkonzentration in der Außenlösung 10^{-4} mol/l.

Glucosekonzentration zu Versuchsbeginn: 15,0 μ mol/ml

Die Zahlenangaben entsprechen Mittelwerten aus 4 - 10 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

JEJUNUM (evertiert)

Inkubations- temperatur (°C)	Volumen d. Serosaf. (ml)	Feuchtgewicht d. Darmgew. (g)	Darmlänge (cm)	Glucose-Konz. d. Serosaf. (μ mol/ml)	Prun.-Konz. d. Serosaf. (μ mol/l)	Transfer v (pmol/cm x min)	$\log v$ (J_{ms})	Gehalt (TC) (nmol/g FG)	im (log TC _m)	Gewebe (log TC _m)	Netto - Transfer ($J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$)
37°C	0,98 $\pm$ 0,02 (6)	0,280 $\pm$ 0,020 (6)	5,05 $\pm$ 0,08 (6)	30,67 $\pm$ 0,60 (6)	86,97 $\pm$ 4,35 (6)	139,99 $\pm$ 5,09 (6)	2,15	249,84 $\pm$ 5,79 (4)	2,40	117,60	
27°C	0,74 $\pm$ 0,02 (7)	0,257 $\pm$ 0,018 (7)	5,31 $\pm$ 0,22 (7)	29,03 $\pm$ 1,25 (7)	34,94 $\pm$ 1,74 (7)	40,78 $\pm$ 2,07 (7)	1,61	216,00 $\pm$ 26,88 (6)	2,33	18,36	
17°C	0,70 $\pm$ 0,01 (8)	0,171 $\pm$ 0,013 (8)	4,76 $\pm$ 0,16 (8)	13,21 $\pm$ 0,11 (8)	32,13 $\pm$ 4,13 (8)	38,58 $\pm$ 3,76 (8)	1,59	220,27 $\pm$ 6,40 (4)	2,34	16,63	
7°C	0,77 $\pm$ 0,01 (8)	0,168 $\pm$ 0,008 (8)	5,23 $\pm$ 0,10 (8)	13,12 $\pm$ 0,11 (8)	32,13 $\pm$ 1,19 (8)	39,75 $\pm$ 0,01 (8)	1,60	128,05 $\pm$ 15,61 (7)	2,11	21,12	

Tabelle III (Fortsetzung 1)

JEJUNUM (nicht evertiert)

Inkubations- temperatur (°C)	Volumen d. Mucosafl. (ml)	Feuchtgewicht d. Darngew. (g)	Darmlänge (cm)	Glucose-Konz. d. Mucosafl. (µmol/ml)	Prun.-Konz. d. Mucosafl. (µmol/l)	Transfer $\frac{J_{am}}{v \times \min}$ (pmol/cm x min)	Gehalt (IC _g) (nmol/g FG)	Im Gewebe (log IC _g)
37°C	0,68 ± 0,06 (8)	0,207 ± 0,012 (8)	4,66 ± 0,13 (8)	n.d.	18,56 ± 2,56 (7)	22,39 ± 3,34 (7)	1,35 ± 17,41 (8)	197,15 ± 17,41 (8)
27°C	0,51 ± 0,03 (8)	0,245 ± 0,011 (8)	4,41 ± 0,11 (8)	* n.d.	23,72 ± 4,08 (8)	22,42 ± 3,53 (8)	1,35 ± 27,76 (6)	190,74 ± 27,76 (6)
17°C	0,56 ± 0,02 (8)	0,263 ± 0,015 (8)	5,06 ± 0,11 (8)	n.d.	24,08 ± 3,86 (8)	21,95 ± 3,25 (8)	1,34 ± 9,35 (5)	188,44 ± 9,35 (5)
7°C	0,66 ± 0,02 (8)	0,239 ± 0,005 (8)	5,77 ± 0,03 (8)	n.d.	19,71 ± 2,03 (8)	18,63 ± 1,59 (8)	1,27 ± 22,57 (8)	175,62 ± 22,57 (8)

* n.d. = not detected

Tabelle III (Fortsetzung 2)

ILEUM (evertiert)

Inkubations- temperatur (°C)	Volumen d. Serosafl. (ml)	Feuchtgewicht d. Darmgew. (g)	Darmlänge (cm)	Glucose-Konz. d. Serosafl. ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)	Prun.-Konz. d. Serosafl. ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	Transfer v ($\mu\text{mol}/\text{cm} \times \text{min}$)	(J_{ms}) $\log v$	Gehalt (TC_m) (nmol/g FG)	im ($\log \text{TC}_m$)	Gewebe	Netto - Transfer ($J_{\text{net}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}}$)
37°C	0,79 ± 0,03 (10)	0,279 ± 0,010 (10)	5,53 ± 0,20 (10)	6,59 ± 0,58 (6)	29,19 ± 0,70 (6)	34,59 ± 7,95 (6)	1,54	153,04 ± 15,63 (10)	2,18	20,57	
27°C	0,76 ± 0,01 (8)	0,210 ± 0,015 (8)	4,38 ± 0,13 (8)	11,26 ± 0,33 (8)	26,87 ± 1,50 (8)	39,10 ± 2,20 (8)	1,59	125,79 ± 29,31 (8)	2,10	23,11	
17°C	0,72 ± 0,01 (8)	0,231 ± 0,014 (8)	5,01 ± 0,19 (8)	11,84 ± 0,04 (8)	30,91 ± 2,52 (8)	36,79 ± 2,08 (8)	1,57	119,77 ± 23,03 (8)	2,08	18,31	
7°C	0,77 ± 0,01 (6)	0,231 ± 0,007 (6)	5,17 ± 0,12 (6)	12,49 ± 0,28 (6)	25,57 ± 1,46 (6)	31,65 ± 2,14 (6)	1,50	139,62 ± 3,53 (6)	2,14	18,96	

Tabelle III (Fortsetzung 3)

ILEUM (nicht evertiert)

Inkubations- temperatur (°C)	Volumen d. Mucosaf.l. (ml)	Feuchtgewicht d. Darmsgew. (g)	Darmlänge (cm)	Glucose-Konz. d. Mucosaf.l. ($\mu\text{mol/ml}$)	Prun.-Konz. d. Mucosaf.l. ($\mu\text{mol/l}$)	Transfer v ($\text{pmol/cm} \times \text{min}$)	$\log v$ ($J_{50\text{m}}$)	Gehalt (TC _g) (nmol/g FG)	im Gewebe (log TC _g)
37°C	0,54 ± 0,03 (8)	0,297 ± 0,007 (8)	4,70 ± 0,07 (8)	7,07 ± 0,46 (8)	15,46 ± 3,00 (8)	14,02 ± 2,03 (8)	1,15	150,06 ± 7,89 (8)	2,18
27°C	0,55 ± 0,04 (8)	0,305 ± 0,007 (8)	4,94 ± 0,12 (8)	10,94 ± 0,43 (5)	16,39 ± 2,94 (5)	15,99 ± 3,90 (5)	1,20	137,42 ± 7,74 (8)	2,14
17°C	0,72 ± 0,02 (8)	0,327 ± 0,010 (8)	5,52 ± 0,21 (8)	12,51 ± 0,18 (5)	17,00 ± 3,48 (5)	18,48 ± 3,55 (5)	1,27	139,26 ± 12,78 (8)	2,14
7°C	0,72 ± 0,01 (8)	0,273 ± 0,005 (8)	5,70 ± 0,06 (8)	13,42 ± 0,16 (8)	11,96 ± 1,98 (8)	12,69 ± 2,21 (8)	1,10	138,87 ± 9,48 (8)	2,14

Tabelle IV

Netto-Verschiebung von PRUNASIN im Konzentrations-Gleichgewicht an evertierten Darmsegmenten des Jejunum und Ileum - TEMPERATURABHÄNGIGKEIT

Methode: Wilson und Wiseman (30) - Versuchsdauer: 120 min

Die Prunasinkonzentration betrug zu Beginn des Versuches 10^{-4} mol/l in der Innen- Außenlösung.

Die Glucosekonzentration zu Versuchsbeginn auf beiden Seiten (Mucosa/Serosa) = $15,0 \mu\text{mol/ml}$.

Am Ende des Versuches wurde die Prunasinkonzentration in der Serosa- (S) und Mucosaflüssigkeit (M) sowie der Gehalt im Gewebe (IC) bestimmt. Quotienten IC/M, S/M und IC/S: Erklärung in Material und Methode (5.3.8) Die Zahlenangaben entsprechen Mittelwerten aus 7 - 8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

JEJUNUM

Inkubations- temperatur (°C)	Volumen der Serosaf. (ml)	Feuchtgewicht d. Darmgewebes (g)	Glucose-Konz. d. Serosaf. ($\mu\text{mol/ml}$)	Prunasin-Konz. der Serosaf. (nmol/ml)	Prunasin-Konz. der Mucosaf. (nmol/ml)	Gehalt im Gewebe IC (nmol/g Fc)	$Q = \frac{IC}{M}$	$Q = \frac{S}{M}$	$Q = \frac{IC}{S}$
37°C	$0,88 \pm 0,02$ (8)	$0,217 \pm 0,015$ (8)	$27,17 \pm 1,21$ (7)	$85,76 \pm 5,58$ (7)	$97,46 \pm 3,25$ (8)	$336,01 \pm 25,17$ (8)	$3,76 \pm 0,26$ (8)	$0,89 \pm 0,07$ (7)	$3,91$
27°C	$0,76 \pm 0,01$ (8)	$0,182 \pm 0,011$ (8)	$20,59 \pm 1,10$ (8)	$70,67 \pm 2,32$ (8)	$103,97 \pm 1,01$ (8)	$225,14 \pm 36,18$ (8)	$2,18 \pm 0,37$ (8)	$0,68 \pm 0,03$ (8)	$3,18$
17°C	$0,74 \pm 0,02$ (8)	$0,180 \pm 0,005$ (8)	$13,09 \pm 0,22$ (8)	$86,55 \pm 0,68$ (8)	$97,99 \pm 1,34$ (8)	$247,85 \pm 14,03$ (8)	$2,54 \pm 0,17$ (8)	$0,88 \pm 0,02$ (8)	$2,86$
7°C	$0,78 \pm 0,01$ (8)	$0,191 \pm 0,014$ (8)	$13,16 \pm 0,06$ (8)	$93,64 \pm 0,87$ (8)	$101,95 \pm 0,85$ (8)	$194,70 \pm 18,89$ (8)	$1,81 \pm 0,18$ (8)	$0,92 \pm 0,01$ (8)	$2,08$

Tabelle IV (Fortsetzung)

ILEUM

Inkubations- temperatur (°C)	Volumen der Serosafl. (ml)	Feuchtgewicht d. Darmgewebes (g)	Glucose-Konz. d. Serosafl. (μmol/ml)	Prunasin-Konz. der Serosafl. (nmol/ml)	Prunasin-Konz. der Mucosafl. (nmol/ml)	Gehalt im Gewebe TC (nmol/g FG)	$Q = \frac{TC}{M}$	$Q = \frac{S}{M}$	$Q = \frac{TC}{S}$
37°C	0,81 ± 0,03 (8)	0,289 ± 0,018 (8)	5,83 ± 0,75 (8)	55,19 ± 3,47 (8)	105,16 ± 1,07 (8)	144,61 ± 21,65 (8)	1,39 ± 0,22 (8)	0,53 ± 0,04 (8)	2,62
27°C	0,74 ± 0,01 (7)	0,252 ± 0,017 (8)	10,53 ± 0,46 (7)	78,09 ± 2,84 (7)	107,37 ± 0,67 (8)	193,48 ± 31,84 (8)	1,80 ± 0,30 (8)	0,73 ± 0,03 (7)	2,48
17°C	0,76 ± 0,00 (8)	0,254 ± 0,012 (8)	12,24 ± 0,11 (8)	84,05 ± 2,68 (8)	103,72 ± 0,81 (8)	215,95 ± 10,92 (8)	2,08 ± 0,10 (8)	0,81 ± 0,03 (8)	2,57
7°C	0,75 ± 0,00 (8)	0,281 ± 0,008 (8)	12,64 ± 0,07 (8)	89,16 ± 1,25 (8)	100,08 ± 0,82 (8)	170,91 ± 5,25 (8)	1,71 ± 0,06 (8)	0,89 ± 0,01 (8)	1,92

Tabelle V

Transfer und Gehalt von ^{14}C - α -Methyl-Glucose im Gewebe an evertierten Jejunum-Segmenten
in Gegenwart von PRUNASIN

Methode: Wilson und Wiseman (30) - Versuchsdauer: 30 min - Temperatur: 37°C

Die α -Methyl-Glucose wurde zu Versuchsbeginn der Außenlösung (Mucosaseite) in einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l sowie 5×10^{-4} mol/l (= $2,2 \times 10^{-4}$ dpm/ml) zugegeben.

Prunasinkonzentration: 1×10^{-4} mol/l - Kontrollperfusate enthielten ausschließlich α -Methyl-Glucose
Glucose wurde durch Dihydroxyacetone ersetzt: $15,0 \mu\text{mol/ml}$

Die Zahlenangaben entsprechen Mittelwerten aus 6 - 8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

JEJUNUM (evertiert)

α -M-Gl-Konzentr. (mol/l)	Volumen (Serosefl.) (ml)	Feuchtgewicht (Darmgewebe) (g)	Darmlänge (cm)	^{14}C -Konzentr. (Serosefl.) (dpm/ml)	^{14}C -Menge (Serosefl.) ($\mu\text{g/cm}$)	^{14}C -Gehalt (Darmgewebe TC) (dpm/g)	Transfer ($\frac{\text{J}}{\text{mg}}$) (mol/cm x 30 min)	Gehalt im Gewebe (IC_{m}) (mol/g x 30 min)
5×10^{-6}	0,71 $\pm$ 0,03 (8)	0,190 $\pm$ 0,011 (8)	5,80 $\pm$ 0,10 (8)	57.732 $\pm$ 4.212 (8)	7.057 $\pm$ 592 (8)	33.113 $\pm$ 2.225 (8)	1,12 x 10^{-9} 0,10 x 10^{-9} (8)	5,27 x 10^{-9} $\pm$ 0,36 x 10^{-9} (8)
	KONTROLLE	0,75 $\pm$ 0,01 (8)	5,52 $\pm$ 0,05 (8)	83.224 $\pm$ 9.606 (6)	11.063 $\pm$ 1.427 (6)	149.616 $\pm$ 11.779 (8)	1,60 x 10^{-9} 0,21 x 10^{-9} (6)	21,70 x 10^{-9} $\pm$ 1,71 x 10^{-9} (8)
5×10^{-4}	0,75 $\pm$ 0,00 (8)	0,173 $\pm$ 0,013 (8)	5,70 $\pm$ 0,03 (8)	32.772 $\pm$ 5.292 (8)	4.323 $\pm$ 709 (8)	16.049 $\pm$ 1.300 (8)	88,20 x 10^{-9} 14,50 x 10^{-9} (8)	32,80 x 10^{-8} $\pm$ 2,65 x 10^{-8} (8)
	KONTROLLE	0,71 $\pm$ 0,05 (8)	5,65 $\pm$ 0,09 (8)	53.955 $\pm$ 5.215 (8)	6.760 $\pm$ 847 (8)	26.867 $\pm$ 1.761 (8)	138,00 x 10^{-9} 17,30 x 10^{-9} (8)	54,80 x 10^{-8} $\pm$ 3,59 x 10^{-8} (8)

Tabelle VI

Bestimmung des INTRA- und EXTRAZELLULÄRRAUMS IN Abhängigkeit der Temperatur an Jejunum- und Ileumsegmenten

Methode: Wilson und Wiseman (30) - Versuchsdauer: 15 min.

Markersubstanz: ^{14}C -Polyethylen-Glycol (PEG 4000)

Die Zahlenangaben entsprechen Mittelwerten aus 8 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

TEMP	INTRAZELL.-RAUM $\mu\text{l}/\text{mg}$		EXTRAZELL.-RAUM $\mu\text{l}/\text{mg}$	
	JEJUNUM	ILEUM	JEJUNUM	ILEUM
37°C	0,4292 $\pm$ 0,0066 (8)	0,3885 $\pm$ 0,0076 (8)	0,0261 $\pm$ 0,0018 (8)	0,0271 $\pm$ 0,0015 (8)
7°C	0,4468 $\pm$ 0,0069 (8)	0,3758 $\pm$ 0,0085 (8)	0,0278 $\pm$ 0,0021 (8)	0,0420 $\pm$ 0,0072 (8)

Tabelle VII

Bestimmung des INTRA- und EXTRAZELLULÄRRAUMS IN Abhängigkeit der Natrium-Konzentration an Jejunum- und Ileumsegmenten

Methode: Fisher und Parsons (6) - Versuchsdauer: 15 min.

Markersubstanz: ^{14}C -Polyethylen-Glycol (PEG 4000)

Die Zahlenangaben entsprechen Mittelwerten aus 5 - 6 Einzelversuchen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Na ⁺ GEHALT	INTRAZELL.-RAUM $\mu\text{l}/\text{mg}$		EXTRAZELL.-RAUM $\mu\text{l}/\text{mg}$	
	JEJUNUM	ILEUM	JEJUNUM	ILEUM
150 mMOL	0,4344 $\pm$ 0,0118 (6)	0,4168 $\pm$ 0,0208 (5)	0,0162 $\pm$ 0,0017 (6)	0,0147 $\pm$ 0,0018 (5)
58 mMOL	0,4375 $\pm$ 0,0065 (6)	0,4561 $\pm$ 0,0088 (6)	0,0211 $\pm$ 0,0024 (6)	0,0165 $\pm$ 0,0023 (6)

L E B E N S L A U F

Persönliches: geboren am 29.06.1954
verheiratet, 1 Kind

Schulbildung:

Volksschule	1960 - 1965
Realschule	1965 - 1971
Gymnasium	1971 - 1974

Zivildienst: Universitätskliniken Bonn
vom August 1974
bis Oktober 1975

Staatliches Examen als Krankenpflegehelfer innerhalb des Zivildienstes

Tätigkeit im Pharmabereich: zur Überbrückung der Wartezeit
bei Sandoz AG Nürnberg auf angestrebten Studienplatz
der Human-Medizin
ab April 1976

Prüfung zum Pharmareferenten November 1979

Medizin-Studium:

1. Staatsexamen	August 1982
2. Staatsexamen	August 1984
3. Staatsexamen	Oktober 1985

Promotionsarbeit:

Am Institut für Pharmakologie
und Toxikologie der LMU München Von November 1982
bis Oktober 1985

Danksagung

Herrn Professor W. Forth

danke ich für die Überlassung des Themas,
für seine wertvollen Ratschläge sowie für die anregenden
Diskussionen über diese Arbeit.

Herrn Dr. G. Strugala

danke ich für die konstruktiven und fruchtbringenden
Gespräche bei der Versuchsplanung sowie für seine
wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung der
Experimente.

Frau Jordan

gilt mein herzlichster Dank für ihre sorgfältige und
zuverlässige medizinisch-technische Assistenz.
Gerne erinnere ich mich an die gute Zusammenarbeit
in stets freundlicher Atmosphäre.

Herrn Feldmeier und seinen Mitarbeitern

möchte ich herzlich dafür danken, daß sie mit den
Einrichtungen ihrer Werkstatt und ihrem
handwerklichen Geschick die Voraussetzungen für gute
Versuchsbedingungen geschaffen haben.

Herrn Wünsch und seinen Kollegen

oblag die Tierpflege sowie die Vorbereitung und
Bereitstellung der Versuchstiere. Bei ihnen möchte ich
mich für ihre Mühe und ihr Entgegenkommen
bedanken.

